

---

NATÉRCIA EMÍLIA PEDRO FERNANDES

*Contribuição para o estudo de resistência aos antimaláricos e  
análise de marcadores moleculares de Plasmodium falciparum e  
do hospedeiro humano, em Maputo, Moçambique*

INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

LISBOA  
2008

---

**NATÉRCIA EMÍLIA PEDRO FERNANDES**

**Médica Pediatra  
Assistente da Faculdade de Medicina de Maputo  
Universidade Eduardo Mondlane  
Moçambique**

**BOLSEIRA DA FUNDAÇÃO PARA A CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
(BOLSA BD/10100/2002)**

***Contribuição para os estudos de resistência aos antimaláricos e análise  
de marcadores moleculares de Plasmodium falciparum e do hospedeiro  
humano, em Maputo, Moçambique***

Dissertação para obtenção do grau de Doutor  
Ramo das Ciências Biomédicas  
Especialidade Parasitologia  
Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais LA  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**LISBOA  
2008**

---

*“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”*

*(Albert Einstein)*

---

*Ao Adérito, aos meus Pais, Irmãos e Sobrinhas*

---

---

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais LA (IHMT) em colaboração com a Faculdade de Medicina de Maputo (UEM), Moçambique; Hospital Central de Maputo, Moçambique; com o Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP), Portugal e com a Universidade do Algarve, Portugal. O trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal (BD/10100/2002).

Para que a sua realização fosse possível, além das entidades referidas, foi fundamental poder contar com o apoio e colaboração de diversas pessoas, às quais quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Doutor. Virgílio do Rosário Director da UEI Malária e membro do CMDT LA, Professor Catedrático do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela orientação deste estudo bem como pelo apoio e prontidão demonstradas no estabelecimento de colaborações com outras instituições de forma a tornar possível a sua realização. À sua disponibilidade na orientação, às boas condições de trabalho que proporcionou e pela confiança que depositou em mim.

Ao Prof. Doutor Pedro Cravo (CMDT LA e IHMT), Professor Auxiliar do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, co-orientador desta dissertação, pela componente de supervisão técnica e científica, a qual foi fundamental para a realização do trabalho de doutoramento. Pela sua permanente disponibilidade no esclarecimento das dúvidas e pela contribuição com comentários e propostas valiosas para o trabalho.

Ao Prof. Doutor Luís Varandas pela amizade, orientação clínico-científica e pelas importantes sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Jorge Rocha (IPATIMUP) e à Prof<sup>a</sup>. Doutora Vera Marques (Universidade do Algarve) pela importante ajuda técnico-científica na realização de algumas partes deste estudo.

A toda a equipa do CMDT LA, por todo apoio e amizade e em especial à Dra. Joana BOM e à Dra. Paula Figueiredo pelo excelente apoio técnico prestado e disponibilidade sempre demonstrada. Um agradecimento especial à Celeste Figueiredo e à Catarina Costa por me ajudarem a resolver as questões burocráticas durante esses anos.

À direcção da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane e a todos colegas do Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo, pelo estímulo e apoio para a continuidade de realização deste trabalho. A todos o meu MUITO OBRIGADO especial.

À Directora do Centro de Saúde de Bagamoyo e à Directora do Centro de Saúde de Boane pela colaboração prestada na colheita das amostras utilizadas neste estudo.

Aos meus queridos amigos, de todas as horas, que me apoiaram de todas as maneiras e pelo encorajamento nos bons e maus momentos.

Ao meu marido que aceitou, sem questionar, as minhas constantes ausências e apoiou a minha formação dando-me carinho, atenção, força, estímulo e coragem. A ele devo a realização de mais esta etapa da minha vida.

---

Aos meus pais, à minha mãe em especial, pela sua extrema compreensão, força e coragem, e por incutir em mim esta vontade de aprender e de lutar.

Aos meus queridos irmãos e sobrinhas sempre presentes. “In memorium” à minha irmã Ricarda com muita saudade. Pela força espiritual transmitida para continuar firme neste projecto.

Aos pacientes que participaram neste estudo.

E a DEUS, pela certeza da vitória e amparo nas horas difíceis.

---

A partir do tema da tese e do conjunto de resultados, apresentados nesta dissertação, foram publicados os seguintes artigos científicos e efectuadas apresentações orais em congressos:

## Publicações

**Fernandes, N.E.,** Cravo, P., do Rosário, V.E. (2007). Sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Maputo, Mozambique: presence of mutations in the dhfr and dhps genes of *Plasmodium falciparum*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 40(4): 447-50.

**Fernandes, N.,** Figueiredo, P., do Rosário, V.E., Cravo, P. (2007). Analysis of sulphadoxine/pyrimethamine resistance-conferring mutations of *Plasmodium falciparum* from Mozambique reveals the absence of the dihydrofolate reductase 164L mutant. *Malar J*. 23;6:35.

## Apresentações Orais

**Fernandes.,N.** Análise das mutações *pfdhfr* e *pfdhps* de *Plasmodium falciparum* em crianças, em Moçambique. XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Porto-Alegre, Brasil (Março 2008).

**Fernandes.,N.** Transmissão da malária nas crianças, em Moçambique. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Campos do Jordão, Brasil (Março 2007).

**Fernandes.,N.** Marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos. 1ª Conferência Moçambicana de Pediatria, Maputo, Moçambique (Dezembro 2007).

**Fernandes.,N.** A Criança com Malária Cerebral: Abordagem Clínica e Terapêutica, em Moçambique. XLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Teresina, Brasil (Março 2006).

**Fernandes.,N.** Problemas no tratamento da malária infantil em Moçambique. 1º Seminário de Terapêutica da Malária dos países de Língua Portuguesa – CPLP; Lisboa, Portugal (Outubro 2006).

---

## SUMÁRIO

A malária é de longe a doença parasitária mais importante em Moçambique, constituindo um grave problema de saúde pública no País. Apesar de se considerar que um diagnóstico atempado e um tratamento correcto são os elementos básicos para um programa de controlo da malária bem sucedido, nas últimas décadas, o controlo e tratamento têm sido bastante dificultados pelo aparecimento e disseminação da resistência parasitária aos antimaláricos mais utilizados. Os mecanismos que conferem ao parasita a capacidade de resistir à maioria dos antimaláricos disponíveis não se encontram completamente elucidados.

Deste modo, este trabalho teve como objectivo principal avaliar o envolvimento dos genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfcr*, *pfmdr1* e *pfATPase6* na resistência aos antimaláricos em Moçambique, recorrendo a populações naturais de parasitas em isolados colhidos de doentes com malária em Maputo, Moçambique. Neste contexto, foi efectuada a caracterização clínica dos pacientes com diferentes formas clínicas de malária e os perfis genotípicos relacionados com a resistência em *P. falciparum* para quatro antimaláricos: cloroquina, sulfadoxina/pirimetamina, amodiaquina e artemisinina, através da técnica de PCR-RFLP, para os polimorfismos *pfcr* K76T e N75E, *pfdhfr* N51I, C59R, S108N e I164L, *pfdhps* A437G e K540E, *pfmdr1* N86Y e N1246Y e *pfATPase6*, G1916A, G110A, A2694T e G2306A.

Os dados genotípicos foram subsequentemente analisados estatisticamente, no intuito de detectar associações significativas entre a presença de um determinado marcador antes e depois do tratamento com os diferentes antimaláricos utilizados. Foram também avaliados os polimorfismos em dois marcadores moleculares (ICAM-1 e CD36) do hospedeiro relacionados com susceptibilidade/resistência à malária, em isolados de pacientes com e sem malária. Os polimorfismos da variante CYP-450 (*CYP2C8*), relacionada com o metabolismo dos fármacos antimaláricos em pacientes com malária, foram também aqui analisados.

Os resultados demonstraram a gravidade do problema de resistência a antimaláricos, evidenciado pelas elevadas prevalências dos alelos mutantes antes e depois dos tratamentos efectuados. Foi aqui observada uma elevação significativa de amostras contendo o alelo mutado *pfdhps* 437G após do tratamento com Fansidar® e com Fansidar®+Amodiaquina.

Verificou-se existir uma correlação positiva entre o quádruplo mutante e o número de isolados, depois do tratamento com Fansidar®. Estes resultados indicam reservas na utilização do Fansidar® como uma componente da primeira linha de tratamento antimalárico no País e apontam o polimorfismo *pfdhps* 437G como um possível marcador para a monitorização da resistência a este fármaco.



---

Apesar de não significativos, os resultados da análise do ICAM-1 mostraram a existência de uma possível associação entre a presença da mutação ICAM-1<sup>kilifi</sup> e a infecção malárica nas suas formas grave e não grave, enquanto para o CD36 foi notória a ausência da mutação T1264G no grupo controle (sem malária). Os resultados da análise dos polimorfismos no gene *CYP2C8* demonstraram alguma inconclusividade, tendo no entanto permitido a obtenção de conhecimentos para estudos que possam ser realizados no futuro.

---

## ABSTRACT

Malaria is the most important parasitic disease and a public health problem in Mozambique. Though a correct therapy and diagnosis are basic for any control program, in the last decades, these have been hampered by the appearance and dissemination of drug resistance to most antimalarials. Mechanisms of drug resistance have not been clarified. This work had the objective to study the relation between a number of molecular markers *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfprt*, *pfmdr1* and *pfATPase6* in drug resistance in Mozambique, in parasite populations collected in Maputo.

Clinical characterization of patients and their profiles associated to resistance in *P. falciparum* was carried out for 4 drugs, chloroquine, combined sulfadoxine/pyrimethamine, amodiaquine and artemisinin, through PCR-RFLP, for polymorphisms in *pfprt* K76T and N75E, *pfdhfr* N51I, C59R, S108N and I164L, *pfdhps* A437G and K540E, *pfmdr1* N86Y and N1246Y and *pfATPase6*, G1916 A, G110A, A2694T and G2306A. Statistical analysis was also carried out for a correct evaluation of presence of certain markers and response to treatment.

Two other polymorphisms were also studied (ICAM-1 and CD36) in association to susceptibility to infection in isolates from people with or without malaria. Finally, polymorphisms of the gene *CYP2C8*, associated to drug metabolization in malaria patients was also investigated

Results confirmed the severity of the problem of drug resistance in malaria, with very high presence and prevalence of mutant alleles in parasite populations before and after treatment. *Pfdhps* 437G after Fansidar® or Fansidar®+Amodiaquine treatment was significantly visible. There was also a positive correlation between a quintuple mutation association and number of isolates Fansidar® treatment. These results recommend reduction of the use of this drug as a component of first-line antimalarial treatment in Mozambique and indicate that *pfdhps* 437G can be used as a marker for resistance in clinical work.

Though not significant, data from the studies with ICAM-1 showed a possible association between the presence of mutation of ICAM-1<sup>kilifi</sup> and malaria infection in their severe and non severe forms, while for CD36 it there was a negative association due to non presence of T1264G in the non malaria control group. The results regarding polymorphisms of the gene *CYP2C8* were limiting in their interpretation, but nevertheless, contributed to the gathering of information that may be used in future studies.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACT** - *Artemisinin-based combination therapy*  
**AMQ** – Amodiaquina  
**BSA** – Albumina Sérica Bovina  
**CD36** - Glicoproteína IV da membrana plaquetária  
**CMDT** – Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais  
**CNBS** - Comité Nacional de Bioética para a Saúde  
**CQ** – Cloroquina  
**CYP** – Citocromos P450  
**°C** - graus centígrados  
**D0** – Dia zero  
**DC** – Dia do controlo  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**DNase** – Deoxiribonuclease I  
**dNTP** – 3'-deoxinucleósido-5'-trifosfato  
**dTMP** – Timidina monofosfato  
**ETF** – *Early treatment failure*  
**FMM** – Faculdade de Medicina de Maputo  
**FPXI** – Ferriprotoporfirina IX  
**G6PD** - *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*  
**γGCS** – *γ glutamylcysteinil synthetase*  
**GPx** – *Glutathione peroxidase*  
**GR** – *Glutathione reductase*  
**GSH** – Glutathione  
**GSSH** – Dissulfido de glutathione  
**GST** – *Glutathione S-transferase*  
**HRPII** - *Histidine rich protein II*  
**ICAM-1** - Molécula de adesão intercelular- 1  
**IC** – Concentração inibitória  
**IC50** - Concentração que inibe o crescimento de 50% dos parasitas  
**IDS** – Inquérito Demográfico de Saúde  
**IHMT** – Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
**INS** – Instituto Nacional de Saúde  
**IRS** – *Indoor Residual Spraying*  
**IPATIMUP** - Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto  
**Kb** – Kilo bases (1000 bp)  
**Kg** – Kilograma  
**Km<sup>2</sup>** – Kilómetros quadrados  
**LTF** – *Late treatment failure*  
**LSDI** – *Lubombo Spatial Development Initiative*  
**MDR** – *Multi drug resistance*  
**MIC** – *Minimum inhibitory concentration*  
**MISAU** – Ministério da Saúde  
**mg** - Miligrama  
**min** – Minuto  
**ml** – mililitro  
**M.O** – Microscopia óptica  
**nM** - Nanomolar  
**OMS** – Organização Mundial de Saúde

---

**PABA** – Ácido p-aminobenzoico  
**pfATPase6** - Gene *Plasmodium falciparum* calcium-transporting ATPase  
**PfATPase6** - Proteína *Plasmodium falciparum* calcium-transporting ATPase  
**pfcr1** – Gene *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter  
**pfctcp** - Gene *Plasmodium falciparum* histamine-releasing factor putative  
**pfdhfr** – Gene *Plasmodium falciparum* dihidrofolato reductase  
**pfdhps** – Gene *Plasmodium falciparum* dihidropteroato sintetase  
**pfmdr1** – Gene *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1  
**pfubp-1** - Gene *Plasmodium falciparum* ubiquitin -specific protease  
**P. falciparum** - *Plasmodium falciparum*  
**P. vivax**- *Plasmodium vivax*  
**P. ovale** - *Plasmodium ovale*  
**P. malariae**- *Plasmodium malariae*  
**P. yoelli**- *Plasmodium yoelli*  
**pbs** – Pares de bases  
**PBS** – Phosphate buffered saline  
**PCR** – Polimerase Chain Reaction  
**PNCM** – Programa Nacional de Controlo da Malária  
**QN** – Quinino  
**R** – Resistente  
**RBM** - Roll Back Malaria  
**RFLP** – Restriction fragment length polymorphism  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**rRNA** – Ácido ribonucleico ribossomal  
**rpm** – Rotações por minuto  
**S** – Sensível  
**SERCA** - Enzima retículo sarco/endoplasmático Ca<sup>2+</sup> ATPase  
**SNP** - Single Nucleotide Polimorfisme  
**S/P** – Sulfadoxina/Pirimetamina  
**TBE** – Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA  
**TCTP** - Translationally controlled tumor protein  
**TDR** - Special programme for Research and Training in Tropical Diseases  
**TE** – Tampão de eluição constituído por Tris EDTA  
**TIP** – Tratamento Intermitente Preventivo  
**TRIS** – Tris (hidroximetil) aminometano  
**tRNA** – Ácido ribonucleico de transporte  
**TS** – Timidilato sintetase  
**U** – Unidades  
**UEI** – Unidade de Investigação e Ensino  
**UEM**- Universidade Eduardo Mondlane  
**UNL** – Universidade Nova de Lisboa  
**UV** – Ultra violeta  
**V** – Volt  
**v/v** – Volume/ volume  
**VCAM-1**- Molécula de adesão às células vasculares  
**VIH** – Vírus de imunodeficiência humana  
**WHO** - World Health Organization

---

## **Aminoácidos e seus símbolos**

A - Alanina (Ala)

C - Cisteína (Cys)

D - Ácido aspártico (Asp)

E - Ácido glutâmico (Glu)

F - Fenilalanina (Phe)

G - Glicina (Gly)

H - Histidina (His)

I - Isoleucina (Ile)

K - Lisina (Lys)

L - Leucina (Leu)

M- Metionina (Met)

N - Asparagina (Asn)

P - Prolina (Pro)

Q - Glutamina (Gln)

R - Arginina (Arg)

S - Serina (Ser)

T - Treonina (Thr)

V - Valina (Val)

W - Triptofano (Try)

Y - Tirosina (Thr)

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Disseminação da malária no mundo.	2
<b>Figura 2-</b> Estádios de desenvolvimento intra-eritrocitário de <i>P. falciparum</i> .	4
<b>Figura 3-</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>	5
<b>Figura 4-</b> Mapa da distribuição geográfica da malária.	7
<b>Figura 5 -</b> Mapa de África e de Moçambique.	8
<b>Figura 6-</b> Principais causas de morte em crianças com menos de 5 anos, em Moçambique.	9
<b>Figura 7-</b> Factores que influenciam o resultado clínico da infecção malárica.	11
<b>Figura 8-</b> Sobreposição das síndromes clínicas na malária grave.	13
<b>Figura 9-</b> Mapa da distribuição geográfica da resistência de <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos.	19
<b>Figura 10 -</b> Resposta clínica do indivíduo ao tratamento, segundo as classificações de 1973 e 1996 propostas pela OMS.	20
<b>Figura 11-</b> Interação entre proteínas expressas à superfície dos eritrócitos parasitados e os receptores do hospedeiro.	21
<b>Figura 12 -</b> Mapa de Moçambique e da província de Maputo	39
<b>Figura 13 -</b> Representação gráfica da amplificação exponencial na técnica de PCR	44
<b>Figura 14 -</b> Evolução do número de pacientes incluídos no estudo	61
<b>Figura 15 -</b> Antimaláricos prescritos e respectivas doses	62
<b>Figura 16 -</b> Distribuição das formas clínicas de malária grave e/ou complicada	67
<b>Figura 17 -</b> Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para identificação dos polimorfismos no gene <i>pfdhfr</i> 51,59,108 e 164	73
<b>Figura 18 -</b> Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para identificação dos polimorfismos no gene <i>pfdhps</i> 437 e 540	74
<b>Figura 19 -</b> Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para identificação dos polimorfismos no gene <i>pfmdr1</i> 86 e 1246	75
<b>Figura 20 -</b> Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para identificação dos polimorfismos no gene <i>pfATPase6</i> .	76
<b>Figura 21 -</b> Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para identificação dos polimorfismos no gene <i>pfcr1</i> 75 e 76.	78
<b>Figura 22 -</b> Prevalência dos SNPs analisados no gene <i>pfATPase 6</i> , antes do tratamento.	90
<b>Figura 23 -</b> Prevalência dos alelos do gene <i>pfcr1</i> .	91
<b>Figura 24 -</b> Padrões de digestão dos fragmentos do exão 10 com a enzima <i>NdeI</i>	94

---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Critérios de malária grave.	12
<b>Tabela 2</b> - Medidas de controlo do vector.	15
<b>Tabela 3</b> - Antimaláricos classificados de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita em que actuam.	16
<b>Tabela 4</b> -Antimaláricos mais utilizados, datas da sua introdução e primeiros registos de resistência ao <i>P.falciparum</i> .	17
<b>Tabela 5-</b> Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em <i>P. falciparum</i> .	24
<b>Tabela 6</b> - Clones de referência de <i>P. falciparum</i> 3D7, Dd2, HB3, K1 e N3.	40
<b>Tabela 7</b> - Condições de amplificação e sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reacções de PCR para a identificação das espécies de plasmódios.	45
<b>Tabela 8</b> - Sequências dos <i>primers</i> e condições de PCR, para a amplificação dos fragmentos dos genes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> , <i>pfcr1</i> , <i>pfmdr1</i> e <i>pfATPase6</i> .	48
<b>Tabela 9</b> - Enzimas e condições de restrição para identificação dos polimorfismos.	52
<b>Tabela 10</b> - Sequência dos primers e condições da restrição utilizadas na análise da mutação ICAM-1 <sup>Kilifi</sup> .	55
<b>Tabela 11</b> - Sequência dos primers e condições da restrição utilizadas na análise da mutação T1264G.	56
<b>Tabela 12</b> - Sequência dos primers e condições da restrição utilizadas na análise dos polimorfismos no gene <i>CYP2C8</i> .	58
<b>Tabela 13</b> - Linhas de tratamento antimalárico, instituídas nos últimos 5 anos, em Moçambique.	62
<b>Tabela 14</b> - Número de amostras analisadas no estudo.	63
<b>Tabela 15</b> - Parasitémias, categorizadas em cruces, nos pacientes com malária no dia de admissão hospitalar (D0).	65
<b>Tabela 16</b> - Prevalências de <i>P. falciparum</i> .	65
<b>Tabela 17</b> - Características dos pacientes com malária grave e/ou complicada, em D0, segundo o tratamento efectuado.	68
<b>Tabela 18</b> - Características dos pacientes com malária não complicada, em D0, segundo o tratamento efectuado.	69
<b>Tabela 19</b> - Frequências alélicas dos genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i> .	80
<b>Tabela 20</b> - Prevalência de mutações nos genes <i>pfdhfr</i> e <i>pfdhps</i> .	81
<b>Tabela 21</b> - Distribuição das mutações múltiplas nos isolados de <i>P. falciparum</i> .	81

---

<b>Tabela 22</b> - Prevalência do triplo mutante ( <i>pfdhfr</i> ) e quántuplo mutante ( <i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i> )	82
<b>Tabela 23</b> - Seleção dos alelos mutados.	83
<b>Tabela 24</b> - Frequências alélicas dos genes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> e <i>pfmdr1</i> .	85
<b>Tabela 25</b> - Prevalência de mutações nos genes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> e <i>pfmdr1</i> .	86
<b>Tabela 26</b> - Distribuição das mutações múltiplas nos isolados de <i>P. falciparum</i> .	87
<b>Tabela 27</b> - Prevalência do triplo mutante ( <i>pfdhfr</i> ) e do quántuplo mutante ( <i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i> ) associado às mutações no gene <i>pfmdr1</i> .	88
<b>Tabela 28</b> - Seleção de alelos mutados.	89
<b>Tabela 29</b> - Distribuição dos polimorfismos no gene <i>ICAM-1</i> .	93
<b>Tabela 30</b> - Distribuição dos alelos mutados e não-mutados no gene <i>ICAM-1</i> .	93
<b>Tabela 31</b> - Distribuição dos polimorfismos no gene <i>CD36</i> .	95
<b>Tabela 32</b> - Frequências dos SNPs de CYP2C8 em isolados de indivíduos infectados com malária .	97



---

## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	v
Publicações	vii
Sumário	viii
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi
Índice de figuras	xiv
Índice de tabelas	xv
 CAPÍTULO I	 1
I - INTRODUÇÃO	2
I.1 - Historial	2
I.2 - Agente etiológico	2
I.2.1 - Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp</i>	3
I.2.2 - Genética de <i>Plasmodium spp</i>	5
I.3 – Distribuição geográfica da malária	7
I.4 - A malária em Moçambique	8
I.5 - Aspectos clínicos da infecção malárica	10
I.6 - Diagnóstico da malária	13
I.7 - Estratégias de controlo da malária	15
I.7.1 - Controlo do vector	15
I.7.2 - Antimaláricos	16
I.8 - Resistência aos antimaláricos	17
I.8.1 – Distribuição geográfica da resistência aos antimaláricos	18
I.8.2 - Classificação da resistência <i>in vivo</i>	19
I.8.3 - Factores que influenciam o aparecimento da resistência	20
I.8.3.1 - Factores relacionados com o hospedeiro humano	20
I.8.3.2 - Factores relacionados aos fármacos antimaláricos	22
I.8.3.3 - Factores relacionados ao parasita	23
I.8.4 - Multiresistência	24
I.8.5 - Potenciais combinações terapêuticas para o tratamento da malária	25
I.8.6 - Modo de acção dos antimaláricos e mecanismos de resistência associados	26
I.8.6.1 - Antimaláricos do grupo das quinoleínas	26

I.8.6.1.1 – Cloroquina	26
I.8.6.1.2 – Amodiaquina	28
I.8.6.1.3 – Quinino	29
I.8.6.2 - Antimaláricos do grupo dos antifolatos	30
I.8.6.3 - Artemisinina e seus derivados	34
I.9 – Objectivos	37
CAPÍTULO II	38
II – MATERIAIS E MÉTODOS	39
II.1- Locais de realização do estudo	39
II.2 - Material biológico	40
II.2.1 – Clones de referência de <i>P. falciparum</i>	40
II.2.2 – Isolados de sangue	40
II.2.2.1 - Colheita e armazenamento dos isolados de sangue	40
II.2.3 – Amostras de mucosa oral	41
II.2.3.1 - Colheita e armazenamento de amostras de mucosa oral	41
II.3- Metodologia	41
II.3.1-Exame clínico dos pacientes do estudo	42
II.3.2 - Detecção e identificação parasitária por Microscopia óptica	42
II.3.2.1- Determinação das parasitémias	43
II.3.3 - Detecção e identificação parasitária por PCR	43
II.3.3.1- Extracção DNA	43
II.3.3.2 - Amplificação do DNA parasitário por PCR	44
II.3.3.3 - Electroforese dos produtos amplificados	46
II.3.4 - Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos	46
II.3.4.1 - Composição dos isolados estudados	46
II.3.4.2 - Análise dos genes <i>pfdhfr</i> , <i>pfdhps</i> , <i>pfmdr1</i> , <i>pfcr1</i> e <i>pfATPase6</i>	46
II.3.4.2.1 – Reacções de PCR	46
II.3.4.2.2 - Electroforese dos produtos amplificados	51
II.3.4.2.3 - Identificação dos polimorfismos por PCR-RFLP	51
II.3.4.2.4 -Electroforese dos produtos da digestão	53
II.3.4.2.5 – <i>Primers</i>	53
II.3.4.3 – Análise estatística	54

<b>II.3.5 - Estudos dos marcadores moleculares do hospedeiro</b>	
relacionados com a susceptibilidade/resistência à malária	<b>54</b>
<b>II.3.5.1 - Composição dos isolados de sangue e amostras</b>	
de mucosa oral estudados	<b>54</b>
<b>II.3.5.2 - Extracção de DNA de isolados de sangue</b>	<b>54</b>
<b>II.3.5.3 - Extracção DNA de amostras de mucosa oral</b>	<b>54</b>
<b>II.3.5.4 - Detecção da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> no gene <i>ICAM-1</i></b>	<b>55</b>
<b>II.3.5.5 - Detecção da mutação T1264G no gene <i>CD36</i></b>	<b>56</b>
<b>II.3.5.6 - Análise estatística</b>	<b>57</b>
<b>II.3.6 - Estudo dos factores genéticos humanos associados ao metabolismo</b>	
dos fármacos antimaláricos	<b>57</b>
<b>II.3.6.1-Composição dos isolados estudados</b>	<b>57</b>
<b>II.3.5.3 - Extracção DNA</b>	<b>57</b>
<b>II.3.6.3 - Identificação dos polimorfismos no gene <i>CYP2C8</i></b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>59</b>
<b>III – RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>III.1 - Identificação das espécies de plasmódios e determinação das parasitémias</b>	<b>64</b>
<b>III.1.1 - Detecção e identificação parasitária por Microscopia óptica</b>	<b>64</b>
<b>III.1.2 - Determinação das parasitémias por Microscopia óptica</b>	<b>64</b>
<b>III.1.3 - Detecção e identificação parasitária por PCR</b>	<b>65</b>
<b>III.1.4 - Resumo</b>	<b>66</b>
<b>III.2 - Caracterização clínica dos pacientes do estudo</b>	<b>67</b>
<b>III.2.1 - Pacientes com malária grave e/ou complicada</b>	<b>67</b>
<b>III.2.2 - Pacientes com malária não complicada</b>	<b>69</b>
<b>III.2.3 - Resumo</b>	<b>70</b>
<b>III.3 - Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos</b>	<b>71</b>
<b>III.3.1- Pesquisa de polimorfismos genéticos</b>	<b>71</b>
<b>III.3.2 - Isolados de pacientes tratados com sulfadoxina/pirimetamina</b>	<b>79</b>
<b>III.3.2.1 - Frequências alélicas</b>	<b>79</b>
<b>III.3.2.2 - Mutações múltiplas</b>	<b>81</b>
<b>III.3.2.3 – Selecção de alelos mutados</b>	<b>82</b>
<b>III.3.2.4 – Resumo</b>	<b>83</b>
<b>III.3.3- Isolados de pacientes tratados com sulfadoxina/pirimetamina+ amodiaquina</b>	<b>84</b>

III.3.3.1 - Frequências alélicas	84
III.3.3.2 - Mutações múltiplas	86
III.3.3.3 – Selecção de alelos mutados	89
II.3.3.4 – Resumo	89
III.3.4 – Isolados de pacientes tratados com sulfadoxina/pirimetamina+artesunato	90
III.3.4.1 – Análise dos SNPs no gene <i>pfATPase6</i>	90
III.3.4.2 – Resumo	91
III.3.5 – Análise dos polimorfismos no gene <i>pfcr1</i>	91
III.3.5.1 – Resumo	91
III.3.6 - Estudo dos marcadores moleculares de susceptibilidade/resistência à malária	92
III.3.6.1- Análise da mutação ICAM-1 <sup>Kilifi</sup> no gene <i>ICAM-1</i>	92
III.3.6.2 - Análise da mutação T1264G no gene <i>CD36</i>	94
III.3.6.3 – Resumo	95
III.3.7 - Estudo dos factores genéticos humanos associados ao metabolismo de fármacos antimaláricos	96
III.3.7.1- Determinação dos polimorfismos no gene <i>CYP2C8</i>	96
III.3.7.2 - Resumo	97
CAPÍTULO IV	98
IV- DISCUSSÃO	99
IV.1 - Identificação das espécies de plasmódios	100
IV.2 - Caracterização das formas clínicas de malária nos pacientes do estudo	102
IV.3 - Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos	103
IV.4 -Estudo dos factores genéticos humanos relacionados com a susceptibilidade/ resistência à malária	112
IV.5 - Estudo dos factores genéticos humanos associados ao metabolismo de fármacos antimaláricos	114
V. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO	116
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
VII. ANEXOS (6 anexos)	147

---

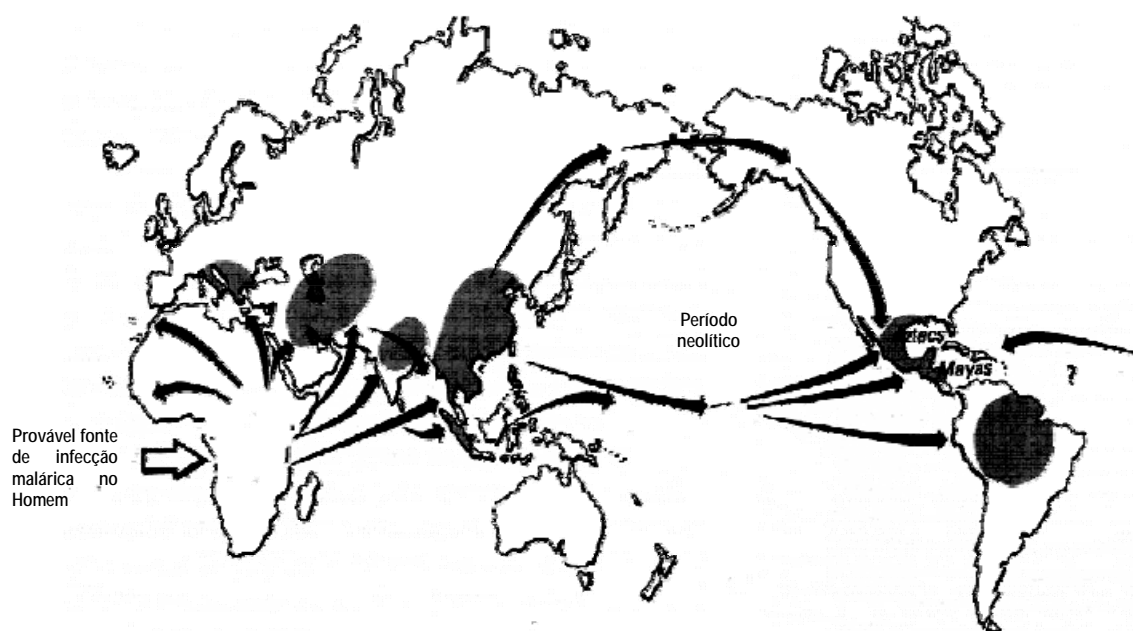
## **CAPÍTULO I**

## I. INTRODUÇÃO

### I.1 - Historial

A malária existe desde a mais remota antiguidade, tendo sido evidenciada por estudos arqueológicos que, através de relatos sobre a ocorrência de febre e esplenomegalia, ou de inscrições em templos egípcios, descreveram sinais representativos da doença. Hipócrates, em seus estudos, descreve quadros febris característicos de malária, além de relatos de esplenomegalia.

A tentativa de se estabelecer a origem da malária no mundo não foi ainda determinada, admitindo-se que tenha tido origem na África tropical onde o parasita adaptou-se bem ao hospedeiro humano (figura 1). Com as migrações humanas, durante o período neolítico, a malária espalhou-se pela Europa, Ásia e Oriente Médio. A disseminação para a América Central e do Sul teve a sua origem, provavelmente, a partir da Ásia mas pode ter chegado às ilhas do Caribe a partir do comércio de escravos (<http://www.malariasite.com/MALARIA/history>).



**Figura 1** - Disseminação da malária no mundo (Adaptado de Wellcome Trust; Ed 1991).

### I.2 - Agente etiológico

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do género *Plasmodium spp*, transmitida por mosquitos do género *Anopheles*. Estes parasitas pertencem ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Ordem Hemosporidiida, Família Plasmodiidae e Género

---

*Plasmodium* (Garnham., 1988). Para além de infectarem o Homem, algumas espécies deste género infectam também mamíferos, aves e répteis. O estudo da malária em primatas não humanos tem tido um grande interesse uma vez que tem servido como modelo experimental, para o estudo da malária humana.

Em regiões tropicais do continente Americano foi identificada a presença, em macacos indígenas, de plasmódios aqui denominados *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium*, estando também presentes as espécies de *Plasmodium malariae* e *Plasmodium vivax*, no Homem. Para o *Plasmodium brasilianum*, verificou-se ser difícil distinguir este do *Plasmodium malariae*, tanto pela morfologia (Contacos *et al.*, 1963) como por ensaios imunológicos (Cochrane *et al.*, 1985) ou moleculares (Fandeur *et al.*, 2000). Da mesma forma, existe uma visível semelhança entre o *Plasmodium simium* e o *Plasmodium vivax* tendo se levado a crer serem parasitas da mesma espécie, infectando hospedeiros diferentes (Collins *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005).

Existem quatro espécies que infectam humanos: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, sendo esta última a espécie mais universal e patogénica, podendo causar quadros graves e fatais.

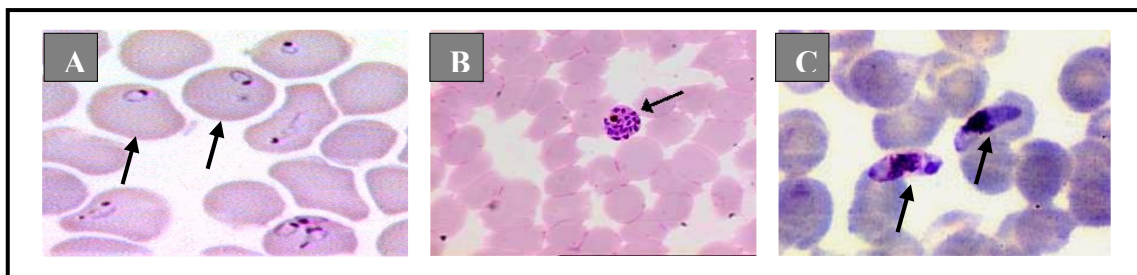
### **1.2.1 - Ciclo de vida de *Plasmodium spp***

O ciclo de vida de *Plasmodium spp* (figura 3) compreende uma fase assexuada endógena (esquizogónica), com um ciclo de multiplicação em hospedeiros vertebrados, onde o desenvolvimento ocorre nas células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exoeritrocitária ou hepática) (A) e nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária) (B), e uma fase sexual exógena (esporogónica) (C), com multiplicação nos mosquitos do género *Anopheles*.

A infecção inicia-se durante a refeição sanguínea do mosquito fêmea infectado quando este inocula, juntamente com a saliva, esporozoítos na corrente sanguínea (1). Os esporozoítos invadem os hepatócitos (2), onde crescem e se multiplicam, diferenciando-se em esquizontes hepáticos (3). A esta fase chama-se esquizogonia hepática (A); a sua duração depende da espécie de *Plasmodium*. No ciclo de vida do *P. vivax* e do *P. ovale* os esporozoítos podem originar hipnozoítos, que permanecem no hepatócito num estado dormente, durante o qual não se dividem, desenvolvendo-se meses ou anos mais tarde, denominando-se a estes casos tardios de sintomatologia, relapsos. No ciclo do *P. falciparum* e do *P. malariae*, inicia-se de imediato a maturação dos esquizontes hepáticos da qual resultam os merozoítos hepáticos que são libertados para a corrente sanguínea por lise dos hepatócitos (4) com consequente invasão dos eritrócitos. Após esta invasão (5), inicia-se a

esquizogonia eritrocitária (B), na qual os merozoítos se diferenciam em trofozoítos e estes por divisões sucessivas dão origem aos esquizontes eritrocitários.

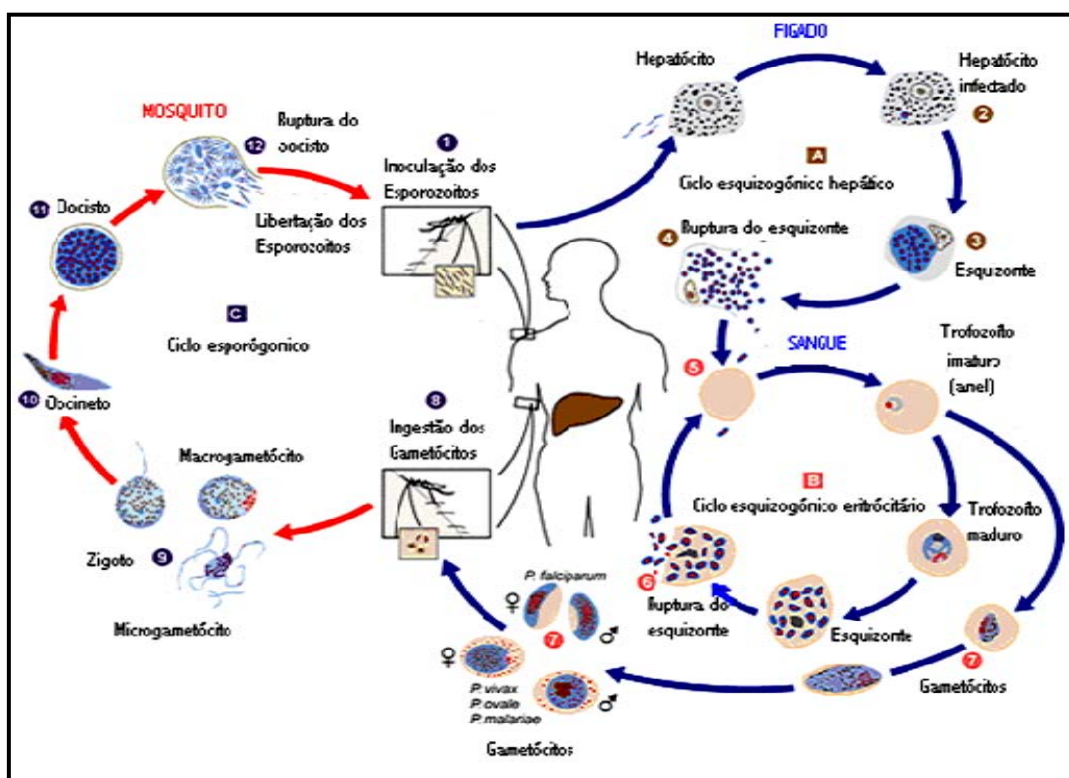
No início da fase eritrocítica, os merozoítos intracelulares diferenciam-se em trofozoítos através de mitoses sucessivas. Os estadios iniciais da fase de trofozoíto apresentam uma forma globular e contêm um vacúolo central que “empurra” o citoplasma para a periferia, situando-se o núcleo num dos pólos, assumindo o parasita uma forma anelar característica, claramente distinguível por microscopia óptica (figura 2). No decorrer do seu desenvolvimento, o trofozoíto digere e metaboliza hemoglobina, dando origem a um pigmento hemo-ferroso, denominado hemozoína. Este pigmento contendo ferro é observado na estrutura do parasita, corado com Giemsa (Merck), sob a forma de grânulos vermelhos escuros, os quais se tornam mais óbvios em estadios mais avançados.



**Figura 2** - Estadios de desenvolvimento intra-eritrocitário de *P. falciparum*. A- fase de anel; B - fase de esquizonte; C - gametócitos (*Adaptado de <http://www.cdc.gov/malaria/>*).

Após lise do eritrócito parasitado, são libertados novos merozoítos na corrente sanguínea (6), com invasão cíclica de novos eritrócitos e sintomatologia febril associada à referida lise celular. Alguns merozoítos, após invasão dos eritrócitos, não evoluem para esquizontes, mas diferenciam-se nas formas sexuais do parasita, os gametócitos feminino e masculino (7). Estes, em fase de maturação, se e quando ingeridos pela fêmea do mosquito durante a refeição sanguínea (8), desenvolvem-se no seu estômago, dando origem, a macrogâmetas e microgâmetas (4 a 8 microgâmetas flagelados) que após fertilização dão início ao ciclo esporogónico (C). O zigoto formado (9) evolui para oocineto (10) móvel, que invade o espaço entre as células epiteliais da parede do estômago do mosquito, fixando-se e originando o oocisto (11). Aqui, por mitoses sucessivas, resultam inúmeros parasitas individuais e alongados denominados esporozoítos (12), que após um período de maturação e por ruptura do oocisto, invadem a cavidade corporal do mosquito e migram para as suas glândulas salivares, acumulando-se nos ductos salivares e tornando-se infectantes. Quando o mosquito infectado faz nova refeição sanguínea (1), os esporozoítos são inoculados e começa uma nova infecção no hospedeiro vertebrado.





**Figura 3** - Ciclo de vida de *Plasmodium spp* (Adaptado de <http://www.dpc.cdc.gov>).

### 1.2.2 - Genética de *Plasmodium spp*

O material genético de *Plasmodium spp* encontra-se organizado em três genomas (Sinden *et al.*, 1985): 1) genoma mitocondrial, com 6Kb, contém os genes que codificam as proteínas de enzimas responsáveis pelo transporte de elétrons; 2) genoma circular plasmídico, com 35Kb, contém os genes que codificam principalmente rRNA, tRNA e proteínas ribossomais; e 3) genoma nuclear, que comporta a maioria dos genes essenciais ao ciclo de vida, alguns dos quais envolvidos na resistência aos antimaláricos. O genoma nuclear haplóide do *Plasmodium* é constituído por 23 mega bases de DNA (Hyman *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 2002), com cerca de 5300 genes (Gardner *et al.*, 2002) e está organizado em 14 cromossomos. Os cromossomos dos parasitas da malária são divididos em duas zonas: um domínio central que contém as regiões codificantes conservadas e as extremidades que são regiões polimórficas (Lanzer *et al.*, 1994). Cada extremidade consiste em regiões teloméricas e subteloméricas, sendo nestas últimas que se encontram os genes envolvidos nas variações antigénicas e onde ocorrem a maioria das variações de tamanho (Gardner *et al.*, 2002).

Durante os ciclos eritrocitário, hepático, esporogónico e a microgametogenese, onde ocorrem divisões mitóticas, o *Plasmodium* é um organismo haplóide, sendo o oocineto a única fase diploide do seu ciclo de vida (Sinden *et al.*, 1985). Quando o mosquito se alimenta num hospedeiro infectado com 2 clones, no estômago do vector pode ocorrer auto fertilização e fertilização cruzada

---

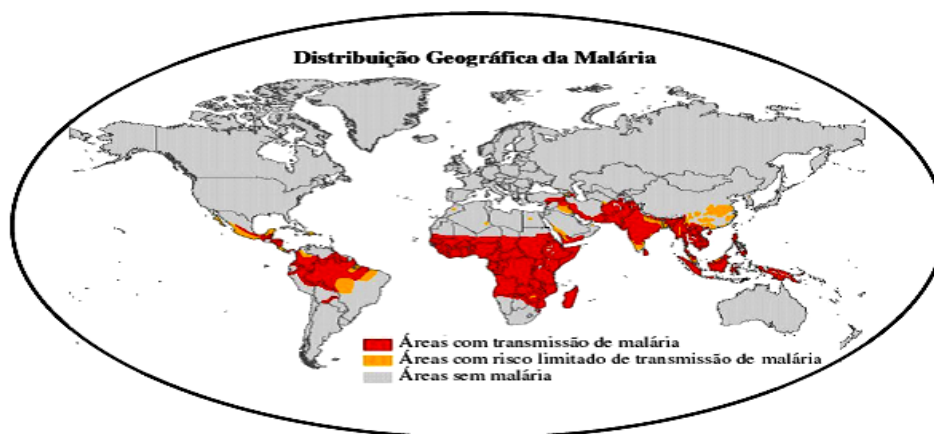
resultando na formação de homozigotos de cada tipo parental e/ou heterozigotos resultantes estes da recombinação das duas formas parentais. Este zigoto, após uma meiose seguida de mitoses sucessivas, dará origem a um elevado número de esporozoitos haplóides representativos das formas parentais ou recombinantes anteriores. Os polimorfismos de tamanho, nos cromossomas, que são observados entre populações parasitárias da mesma espécie, podem ser devidos a re-arranjos dos cromossomas (Frontali *et al.*, 1991), recombinação génica durante a meiose (Sinnis & Wellems, 1988; Corcoran *et al.*, 1986), amplificação génica (Foote *et al.*, 1989; Triglia *et al.*, 1991) e deleções ou inserções de sequências de DNA telomérico e subtelomérico (Corcoran *et al.*, 1986).

A recombinação genética é bastante elevada em populações naturais de *P. falciparum* (Conway *et al.*, 1999). Em concordância, esta tendência foi verificada em duas experiências laboratoriais independentes, com cultura *in vitro* de 2 clones de *P. falciparum* bem caracterizados e diferenciados, nomeadamente os clones HB3 e 3D7 (Walliker *et al.*, 1987) e os clones HB3 e Dd2 (Wellems *et al.*, 1990), onde gametócitos foram produzidos e posteriormente alimentados artificialmente a mosquitos, em insectário. Da recombinação genética resultaram novos genótipos confirmando a diversidade parasitária após um cruzamento genético, recombinantes estes com, possivelmente, maior capacidade de sobrevivência e adaptação a alterações do ambiente circundante, tais como uma pressão de fármacos.

O genoma do clone de *P. falciparum* 3D7 foi totalmente sequenciado em 2002 (Gardner *et al.*, 2002), o que permitiu alargar os conhecimentos nesta área e desenvolver estudos de proteómica, a partir dos quais foram identificadas cerca de 2400 proteínas (Florens *et al.*, 2002). A publicação da sequência completa do genoma do *P. falciparum* e de outros parasitas da malária proporcionou novas oportunidades em termos de estratégias para identificação de mecanismos de resistência aos antimaláricos. Deve-se acentuar, contudo, que a total aplicação do conhecimento do genoma do parasita, a futuros e bem sucedidos programas de controlo da malária, é um alvo a atingir a muito longo prazo.

### I.3 - Distribuição geográfica da malária

A distribuição geográfica da malária, a nível mundial (figura 4) incide sobre regiões tropicais e subtropicais, onde estão reunidas todas as condições para ocorrência de transmissão do parasita (W.H.O., 2005a). A transmissão da malária ocorre na África sub – Sahariana, América Central e do Sul, Médio Oriente, sudoeste Asiático e Oceânia, verificando-se no entanto variações na intensidade de transmissão e risco de infecção em cada uma destas zonas.



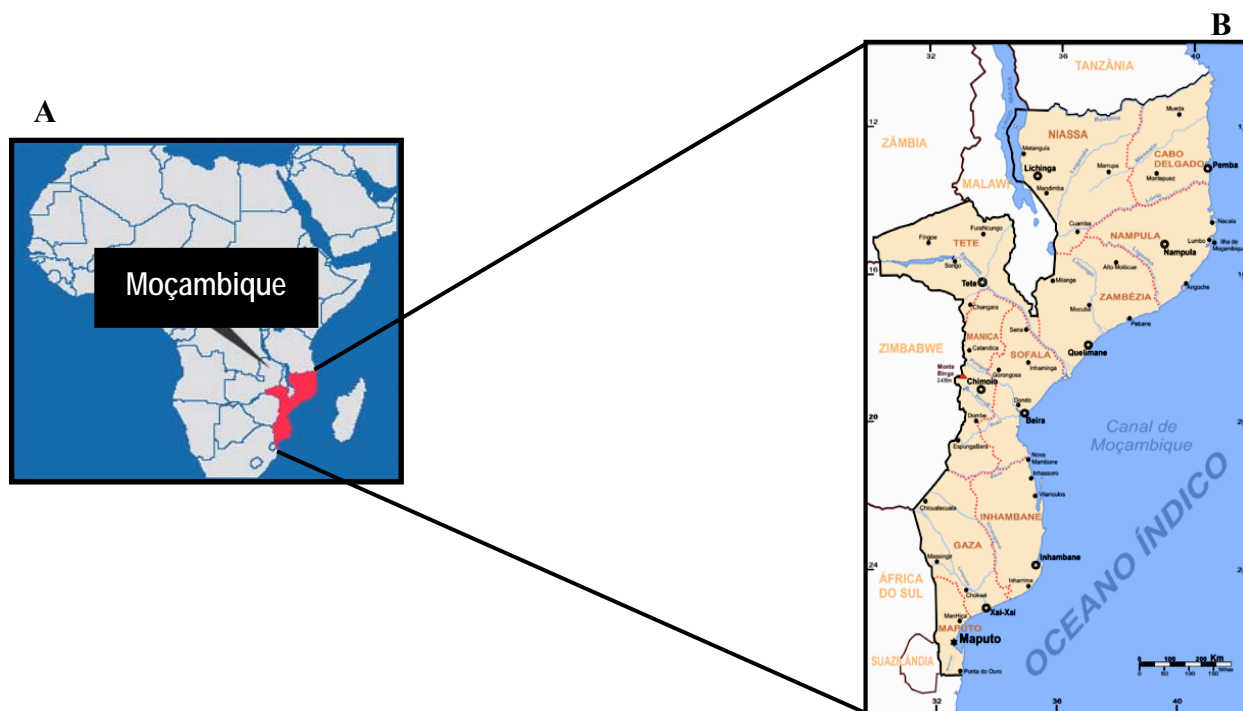
**Figura 4** - Mapa da distribuição geográfica da malária (*Adaptado de <http://www.rbm.who.int>*).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a malária é endémica em mais de 90 países em todo o mundo de onde resulta que cerca de 40% da população global vive em áreas endémicas de malária (W.H.O., 2005a). Estima-se que esta doença afecte entre 300 a 500 milhões de pessoas, causando mais de um milhão de mortes anualmente das quais 75% em crianças Africanas (White *et al.*, 1999; Wongsrichanalai *et al.*, 2002; W.H.O., 2005a).

Em face do fenómeno do aquecimento global (<http://www.eden-fp6project.ne>) e do aumento das migrações humanas, a malária é hoje considerada uma doença com possibilidade de reemergir em áreas de onde já foi erradicada ou onde é controlada (Kovats *et al.*, 2001; IGPC., 2007; MacPherson *et al.*, 2007).

## I.4 – A malária em Moçambique

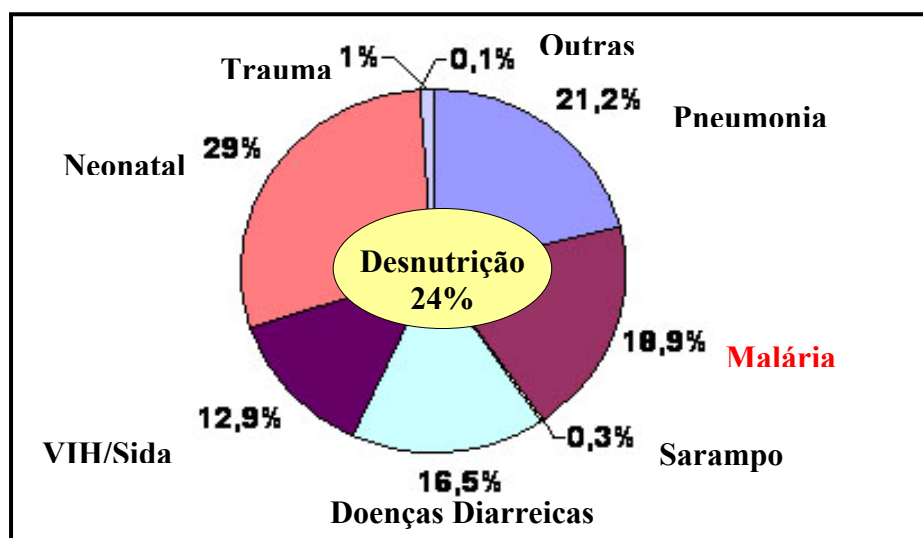
A República de Moçambique está situada na costa sul-oriental de África, cobrindo uma superfície de 799.380 Km<sup>2</sup> e com uma costa de cerca de 2.515 Km (figura 5). Segundo o censo populacional de 2007, o País possui uma população de 20.530.714 habitantes com uma densidade populacional de 25,68 habitantes/Km<sup>2</sup>. A população é essencialmente jovem, com cerca de 44,8% com idade inferior a 15 anos, e vivendo principalmente em zonas urbanas ou semiurbanas.



**Figura 5** - Mapa de África (A) e de Moçambique (B) (*Adaptado de INE, Moçambique*)

A malária é endémica em todo o País, atingindo o seu ponto mais alto após a época das chuvas (Dezembro à Abril). A intensidade da transmissão varia de ano para ano e de região para região, dependendo da precipitação, altitude e temperaturas. O *P. falciparum* é o parasita prevalente, sendo responsável por cerca de 90% de todas infecções maláricas, enquanto que o *P. malariae* e o *P. ovale* são responsáveis por 9.1% e 0.9% das infecções, respectivamente (PNCM, MISAU).

Em Moçambique, tal como na maior parte dos países da África sub-Sahariana, a malária representa a principal causa de consulta e de admissão hospitalar (Bassat *et al.*, 2008), sendo ainda uma das principais causas de mortalidade nos hospitais (figura 6). A prevalência desta doença no grupo etário dos 2 aos 9 anos de idade varia entre 40 e 80%, chegando a 90% em algumas regiões do País. Nos serviços de pediatria, a malária é responsável por 40% de todas consultas externas e por cerca de 60% dos internamentos (PNCM, MISAU).



**Figura 6** - Principais causas de morte em crianças com menos de 5 anos, em Moçambique (Adaptado de *World Health Report*, 2005).

O Programa Nacional de Controlo da Malária (PNCM) foi criado em 1982, tendo adoptado formalmente 3 principais estratégias: i) diagnóstico precoce; ii) controle vectorial e; iii) educação para a saúde. Os primeiros casos de malária resistentes à cloroquina (CQ) em Moçambique foram identificados em 1983 (Schawlbach *et al.*, 1985), tendo esta constatação levado o Instituto Nacional de Saúde (INS) a realizar estudos sistemáticos que permitiram detectar, ainda em 1983, outros casos de resistência a este fármaco (INS., 1985 e 1986). Devido a este facto, a primeira linha de tratamento da malária no País foi alterada, tendo-se adoptado a combinação S/P associada à amodiaquina (AMQ). No entanto, vários factores, como a fraca adesão na toma da AMQ, as recomendações da OMS para o tratamento da malária com combinações com derivados da artimisinina e os resultados do projecto conjunto “Lubombo Spatial Development Initiative” (Sharp *et al.*, 2007), entre Moçambique, África do Sul e Swazilândia, para o combate da malária, fizeram com que em 2004 a política de tratamento da malária no País fosse novamente alterada, passando a constar como primeira linha de tratamento a combinação S/P associada ao artesunato.

Assim sendo, actualmente os antimaláricos utilizados para o tratamento da malária não complicada consistem na associação terapêutica entre o artesunato e a combinação sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®), como primeira linha de tratamento, e a associação do artesunato com lumefantrina (Coartem<sup>TM</sup>) como segunda linha de tratamento. Para o tratamento da malária grave é utilizado o quinino (PNCM, MISAU).

---

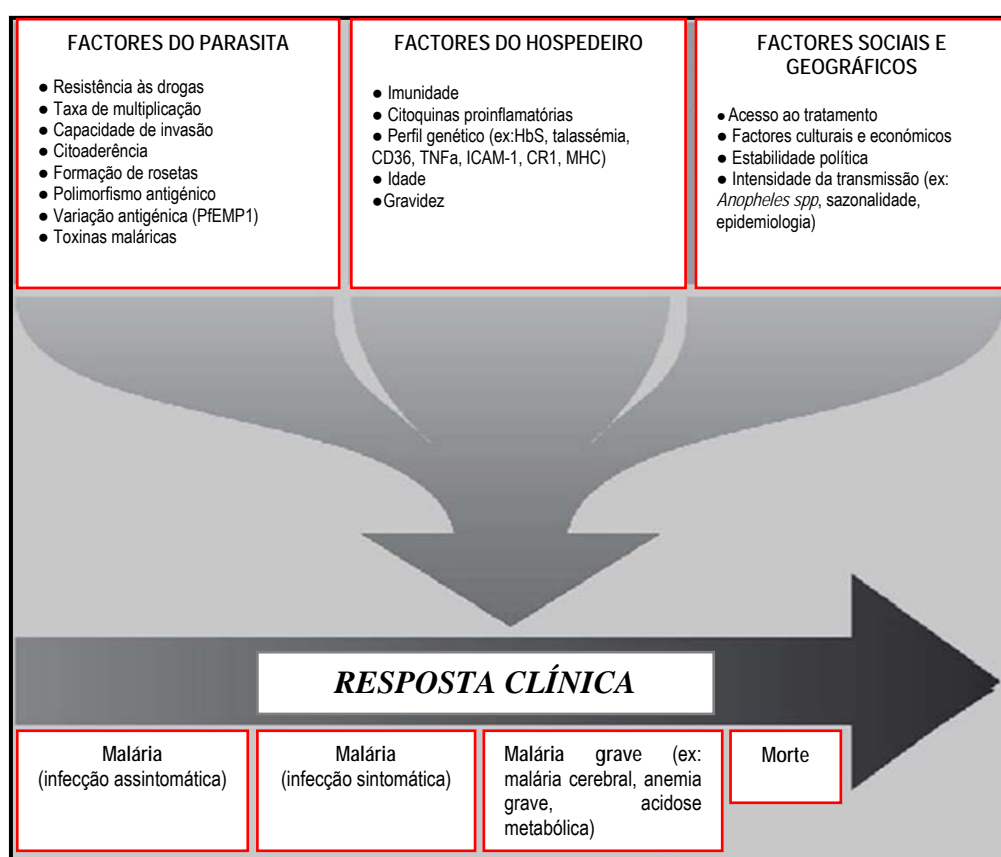
## 1.5 - Aspectos clínicos da infecção malárica

O quadro clínico típico é caracterizado por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese profusa e cefaleia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie do parasita infectante. Em alguns pacientes, os sintomas prodrômicos, como náuseas, vômitos, astenia, fadiga e anorexia, surgem vários dias antes dos paroxismos da doença. A fase sintomática inicial caracteriza-se por mal-estar, cansaço e mialgia. O ataque paroxístico inicia-se com calafrios, acompanhado de tremor generalizado, com duração entre 15 minutos a 1 hora. A fase febril, onde a temperatura pode atingir os 41°C, pode ser acompanhada de cefaléia, náuseas e vômitos. Segue-se a fase de apirexia, caracterizada pelo declínio da temperatura e diminuição dos sintomas, que causa uma sensação de melhora no paciente. Esta fase pode durar 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae*. No entanto, esta regularidade é pouco comum devido a vários factores como por exemplo: o tratamento precoce realizado na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas, a infecção por populações distintas de plasmódios e a variabilidade da resposta imune. Em crianças, é comum o aumento do fígado e do baço sendo que o primeiro pode ser palpável no final da primeira semana após o início da sintomatologia e o segundo a partir da segunda semana da doença (<http://www.malariasite.com>). A anemia é também um achado frequente neste grupo, podendo ser bastante acentuada. No entanto, o grau de anemia está na dependência de diversos factores, entre os quais as parasitoses intestinais e desnutrição.

Investigações realizadas por Greenberg e colaboradores (Greenberg *et al.*, 1989) relacionam o aumento da incidência da anemia grave, na infecção malárica, à disseminação da resistência do *P. falciparum* à cloroquina, em África. Esta relação é explicada pelo facto de, apesar dos pacientes melhorarem clinicamente após o tratamento com cloroquina não haver uma destruição completa dos parasitas, o que faz com que a reticulocitose esperada não ocorra e, ao longo do tempo, com repetidas infecções maláricas os pacientes desenvolvam anemias crónicas que podem tornar-se graves e fatais (Greenberg *et al.*, 1989; Lackritz *et al.*, 1992; Bloland *et al.*, 1993). Em Moçambique, mais de metade dos casos de malária apresentam anemia moderada ou grave (Guinovart *et al.*, 2008).

A presença de hipoglicemia, convulsões, vômitos repetidos, hiperpirexia, icterícia, hemorragias e distúrbios da consciência, são indicadores de mau prognóstico. Esses sintomas podem preceder formas clínicas de malária grave e complicada, como por exemplo a malária cerebral, a malária associada à anemia grave, a insuficiência renal aguda, o edema pulmonar agudo, a disfunção hepática e hemoglobinúria, entre outras (Trampuz *et al.*, 2003).

A diversidade das síndromes clínicas causadas por esta infecção (figura 8) pode confundir a identificação dos vários mecanismos da doença. No entanto, existem alguns processos básicos relacionados às formas graves de malária como por exemplo: i) a localização específica das hemáceas parasitadas em órgãos alvo; ii) a acção local e sistêmica dos produtos bioactivos do parasita (ex: toxinas); iii) a produção local e sistêmica de substâncias pró- inflamatórias e citocinas, pelo sistema imune inato e adaptado em resposta aos produtos do parasita e; iv) a activação, seqüestro e infiltração de células inflamatórias (figura 7) (Newton *et al.*, 1998; Weatherall *et al.*, 2002).



**Figura 7** - Factores que influenciam o resultado clínico da infecção malárica (*Adaptado de Weatherall et al., 2002*)

A Organização Mundial da Saúde define a malária grave como a presença de parasitémia associada a um ou mais dos seguintes sinais/síntomas: prostração, alteração da consciência, “distress” respiratório ou edema pulmonar agudo, convulsões, colapso circulatório, acidose metabólica, hemorragias e coagulação intravascular disseminada, icterícia, hemoglobinúria e anemia grave (tabela 1).

**Tabela 1 - Critérios de malária grave**

<b>Critérios de malária grave (O.M.S)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Malária cerebral. Coma não atribuível a outra causa, num paciente infectado <i>Plasmodium falciparum</i>.</li><li>• Crises convulsivas generalizadas ou repetidas: mais de 2 em 24 horas ou estado pós-convulsão de mais de 1 hora de duração.</li><li>• Anemia normocítica severa: hematócrito &lt;15% ou hemoglobina &lt;5 g/dl com parasitemia superior a 10.000 parasitas/μl. Se a anemia for hipocrômica e/ou microcítica deve excluir-se a anemia ferropénica e as hemoglobinopatias.</li><li>• Insuficiência renal: definida como diurese &lt;400 ml/ 24 horas em adultos ou 12 ml/Kg/24 horas em crianças, na ausência de desidratação ou creatinina &gt; 265 μmol/l (&gt;3 mg/dl).</li><li>• Edema agudo de pulmão ou “distress” respiratório do adulto. Pode aparecer vários dias após o início do tratamento antimalárico ou quando a parasitemia tiver diminuído. Deve-se distinguir daquele causado pela sobrecarga hídrica.</li><li>• Hipoglicémia: &lt; 2.2 mmol/l (40 mg/dl).</li><li>• Choque.</li><li>• Coagulação intravascular disseminada.</li><li>• Acidose metabólica.</li><li>• Hemoglobinúria.</li><li>• Hiperparasitemia &gt; 5% em indivíduos semi-imunes.</li></ul>
Na malária grave é frequente a ocorrência de falência multiorgânica

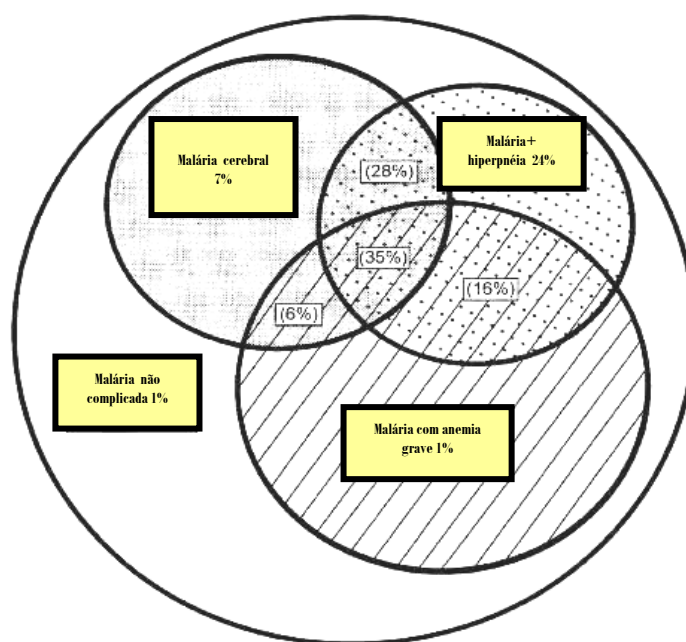
*(Adaptado de Report of a WHO Technical Consultation., WHO, 2001)*

A malária grave em crianças africanas inclui principalmente três síndromes clínicas: malária cerebral, anemia grave e a malária associada à hiperpnéia (respiração rápida e profunda). Apesar de estudos realizados no Quênia (Marsh., 1992), Malawi (Slutsker *et al.*, 1994) e Nigéria (Olumese *et al.*, 1995) sugerirem que a presença destas síndromes clínicas varia com as diferentes faixas etárias, na África sub-Sahariana, existe uma sobreposição extensiva dos mesmos (figura 8), podendo estes



ocorrerem isoladamente ou em combinação (Marsh *et al.*, 1995). Normalmente, os acompanhantes destas crianças referem febre de evolução de 1 à 3 dias, antes da admissão hospitalar, enquanto que as manifestações neurológicas, quando presentes, iniciam-se usualmente 12 horas após a admissão (Musoke., 1966).

Apesar da maioria das mortes ocorrer nas 24 horas, após a instituição do tratamento, os pacientes que sobrevivem recuperam plenamente ao fim de 48 horas (Waller *et al.*, 1995). No entanto, cerca de 9 a 12% dos sobreviventes com malária grave, principalmente a forma cerebral, ficam com sequelas neurológicas (Newton *et al.*, 1998; Warrell., 1999).



**Figura 8** - Sobreposição das síndromes clínicas na malária grave (*Adaptado de Marsh et al., 1995*)

## I.6 - Diagnóstico da malária

A importância da identificação acurada do agente etiológico da malária tem como principal objectivo o tratamento adequado e atempado do paciente. Neste âmbito, o diagnóstico da malária deve levar sempre em consideração dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

---

● **Diagnóstico epidemiológico:** para este tipo de diagnóstico é necessário avaliar as seguintes informações: a) área de procedência do caso; b) existência de casos na região e c) tempo de permanência na área endêmica.

● **Diagnóstico clínico ou presuntivo:** o elemento fundamental no diagnóstico clínico da malária, tanto nas áreas endêmicas como não-endêmicas, é sempre assumir a possibilidade da doença uma vez que indivíduos semi-imunes podem ser portadores assintomáticos. Como a distribuição geográfica da malária não é homogênea, nem mesmo nos países onde a transmissão é elevada, torna-se importante durante o exame clínico colher informações sobre a área de residência ou relato de viagens às áreas endêmicas. Além disso, informações sobre transfusões de sangue, partilha de agulhas em usuários de drogas injectáveis e transplantes de órgãos podem sugerir a possibilidade de malária induzida.

● **Diagnóstico laboratorial:** O diagnóstico de confirmação da infecção malárica só é possível pela demonstração da presença do parasita ou de antígenos relacionados, no sangue do paciente. Por outro lado, a presença de anticorpos ou DNA parasitário podem indicar a existência de uma infecção anterior. Alguns métodos de diagnóstico laboratorial estão descritos a seguir:

- Microscopia óptica: é uma técnica que consiste na observação de uma gota espessa de sangue, para a identificação rápida dos parasitas, e de um esfregaço sanguíneo para a observação a identificação das espécies de plasmódios, sua morfologia e seus estágios de desenvolvimento. Para esta técnica é necessário fazer a coloração de Giemsa (Merck).
- Imunotestes: também chamados de testes rápidos, são baseados na detecção de antígenos específicos do parasita, por imunocromatografia, utilizando anticorpos monoclonais e policlonais.
- Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR): consiste numa técnica molecular que permite replicar artificialmente (*in vitro*) o DNA parasitário, através da enzima polimerase de DNA. Esta enzima reconhece pequenas sequências nucleotídicas às quais se liga extendendo as cadeias de DNA e produzindo uma cópia complementar que se reproduz através da adição de nucleótidos causando uma amplificação exponencial do DNA.

## **I.7 - Estratégias de controlo da malária**

O controlo da malária tem por objectivo principal a redução da taxa de infecção, bem como a de morbilidade e mortalidade causada pela doença. Devido à ausência de uma vacina eficaz, apesar de inúmeros candidatos à mesma (Macete *et al.*, 2007 a,b), os métodos utilizados no controlo da malária baseiam-se essencialmente em medidas de prevenção, através do controlo do vector e da educação sanitária, e em medidas terapêuticas como o tratamento farmacológico da doença.

### **I.7.1 - Controlo do vector**

Esta estratégia resulta de um conjunto de acções integradas que têm, por base, as características dos locais de intervenção tais como a biologia do vector aí existente, a taxa de transmissão da infecção e a morbilidade da doença nessa área, as infra-estruturas de saúde existentes e seus recursos, as condições ambientais e mesmo a situação sócio-económica dos residentes. Para o sucesso duma campanha de controlo do vector é necessário a colaboração entre os serviços de saúde e entidades públicas ou privadas, com impacto na educação na saúde em geral, sobre o tipo de vector, o envolvimento das comunidades locais, a existência de legislação e regulamentos de suporte, assim como o uso racional de insecticidas e boas práticas de manuseamento dos mesmos (W.H.O., 2006a). As medidas principais, utilizadas na prevenção da malária pelo controlo do vector estão exemplificadas na tabela que se segue (tabela 2).

**Tabela 2** - Medidas de controlo do vector

<b>Ação</b>	<b>Medida</b>
Redução do contacto homem-mosquito	Redes mosquiteiras tratadas com insecticidas Uso de repelentes Uso de roupa protectora Protecção das casas
Destruição dos mosquitos adultos	Redes mosquiteiras tratadas com insecticidas Pulverização residual domiciliária Uso de insecticidas
Destruição das larvas de mosquitos	Controlo biológico Uso de larvicidas nas águas
Redução dos criadouros	Saneamento básico Drenagem
Participação social	Educar e motivar a participação da comunidade

### I.7.2 - Antimaláricos

Os primeiros tratamentos das febres provocadas pela malária foram realizados recorrendo a plantas medicinais, sendo as principais isoladas a partir de árvores de *Chinchona* (quinino) e de *Artemisia annua* (artemisinina). O quinino foi, em determinada época, o único fármaco disponível na terapia e profilaxia da malária (Wernsdorfer 1994; Menezes *et al*, 2001). A partir da estrutura deste composto foram desenvolvidos vários análogos, como por exemplo a cloroquina e a amodiaquina.

A cloroquina foi considerada o antimalárico ideal por ser pouco tóxico, bastante eficaz, de fácil administração e economicamente acessível (Menezes *et al.*, 2001). Assim, durante um longo período de tempo a cloroquina foi considerada como o antimalárico de primeira linha no tratamento da malária não grave. No entanto, o aparecimento e a propagação de resistências a este fármaco originou uma utilização mais frequente dos antimaláricos da classe dos antifolatos, para os quais rapidamente se verificou uma diminuição da susceptibilidade do parasita e o desenvolvimento da resistência. A perda de eficácia da cloroquina e dos antifolatos originaram um aumento progressivo no uso da mefloquina e, mais recentemente, da artemisinina e seus derivados.

Existem diversos antimaláricos disponíveis para o tratamento de infecções por *Plasmodium spp* que podem ser classificados com base na estrutura química e/ou no principal mecanismo de acção ou com base no local de acção no ciclo evolutivo do parasita, sobre a qual incide a sua acção. Estes podem ser nomeadamente: a) esquizonticidas sanguíneos, que actuam sobre a fase intraeritrocitária impedindo o desenvolvimento dos parasitas à fase de esquizonte; b) esquizonticidas tecidulares, que previnem o desenvolvimento de esquizontes hepáticos; c) hipnozoiticidas, que actuam sobre os hipnozoítos hepáticos, nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* e d) gametocidas, que destroem as formas sexuais intra-eritrocíticas (Frédérich *et al.*, 2002) (tabela 3).

**Tabela 3** - Antimaláricos classificados de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita em que actuam (*Adaptado de Frédérich et al., 2002*)

Esquizonticidas sanguíneos	Cloroquina, Mefloquina, Quinino, Halofantrina, Artemisinina; Pirimetamina, Sulfonamidas, Atovaquona, Antibióticos
Esquizonticidas tecidular	Primaquina, Pirimetamina, Sulfonamidas
Hipnozoiticidas	Primaquina
Gametocidas	Primaquina – <i>P. falciparum</i> Quinino – <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> Artemisinina – <i>P. falciparum</i>

Actualmente a OMS recomenda o uso de combinações terapêuticas, preferencialmente com derivados de artemisinina (ACTs), no tratamento de malária não complicada por *P. falciparum* (W.H.O., 2006b). As vantagens da utilização dos ATCs estão relacionadas com o modo de acção e características muito particulares desta classe de fármacos, tais como: a rápida e significativa redução da parasitemia, a rápida resolução dos sintomas clínicos, a eficácia contra estirpes de *P. falciparum* multiresistentes, a redução do transporte de gametócitos (o que reduz a transmissão), a boa tolerância, a ausência de resistência documentada e os poucos efeitos clínicos adversos (<http://www.rbm.who.int/>). O conceito de terapia combinada baseia-se no potencial sinérgico ou aditivo de dois ou mais medicamentos, a fim de melhorar a eficácia terapêutica e retardar o desenvolvimento de resistências aos componentes individuais da associação.

### I.8 - Resistência aos antimaláricos

A resistência aos antimaláricos é um dos principais factores que limitam o sucesso do tratamento da malária, sendo responsável pelo mais recente aumento de mortalidade relacionado com malária, principalmente em África (White., 2004). O fenómeno de resistência aos antimaláricos já foi descrito em três das quatro espécies que infectam humanos. O *P. falciparum* desenvolveu resistência à maioria dos antimaláricos existentes, excepto para a artemisinina e seus derivados (tabela 4.), o *P. vivax* possui já documentada resistência à cloroquina, à primaquina e à sulfadoxina/pirimetamina (Murphy *et al.*, 1993; Looareesuwan *et al.*, 1997) e em *P. malariae* foi descrita resistência à cloroquina (Maguire *et al.*, 2001).

Sendo o *P. falciparum* a espécie com maior prevalência nas zonas endémicas e também com maior virulência, a resistência aos antimaláricos nesta espécie é um problema alarmante ao nível da saúde pública e responsável por quebra de diversos programas de controlo (Murphy *et al.*, 1993; Looareesuwan *et al.*, 1997).

**Tabela 4** - Antimaláricos mais utilizados, datas da sua introdução e primeiros registos de resistência ao *P. falciparum*.

Fármaco	Introduzido em	Primeiro registo de resistência	Diferença (anos)
Quinino	1632	1910	278
Cloroquina	1945	1957	12
Proguanil	1948	1949	1
Sulfadoxina-pirimetamina	1967	1967	0
Mefloquina	1977	1982	5
Atovaquona	1996	1996	0
Artemisinina e derivados	1980	-	-

(Adaptado de Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

---

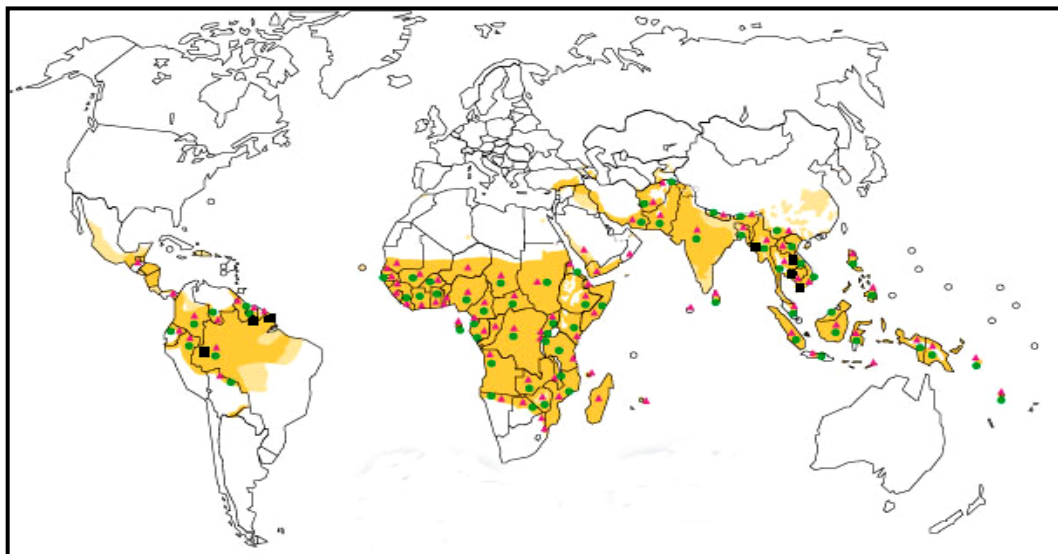
A resistência aos antimaláricos tem ainda como consequência maior um aumento do custo global dos programas de controlo da doença, considerando que as falhas terapêuticas requerem novas consulta nos centros de saúde ou hospitais para novo diagnóstico e tratamento, resultando na perda de dias de trabalho pelos adultos e absentismo escolar por parte das crianças (W.H.O., 2005a).

### **I.8.1 - Distribuição geográfica da resistência aos antimaláricos**

A resistência aos antimaláricos distribui-se geograficamente de forma diferente dependendo da espécie de *Plasmodium* e do antimalárico (figura 9). No *P. malariae* foi registada resistência à cloroquina na Indonésia (Maguire *et al.*, 2001). No *P. vivax* a resistência à S/P foi registada em diversas regiões, e no caso da cloroquina na Indonésia, Timor Este, Papua Nova Guiné e no Peru (W.H.O., 2006b). Na Tailândia surgiu *P. vivax* tolerante à primaquina (Looareesuwan *et al.*, 1997).

Os primeiros relatos de resistência de *P. falciparum* à cloroquina surgiram na América do Sul, na Colômbia em 1959 (Moore & Lanier, 1961), na Venezuela (Maberti, 1960) e no Sudeste Asiático, em 1960 (Harinasuta *et al.*, 1962). Em África, foram reportados casos de resistência à cloroquina, em 1978, no Quênia e Tanzânia. Actualmente, parasitas resistentes à cloroquina encontram-se em todas as zonas onde a malária é endémica, com excepção em algumas regiões na América Central.

A resistência à S/P ocorre frequentemente no Sudeste Asiático e América do Sul sendo prevalente em África. A resistência à mefloquina é frequente em algumas áreas do Sudeste Asiático, como Cambodja, Tailândia, Vietname, e na América do Sul (Amazónia) (W.H.O., 2005b).

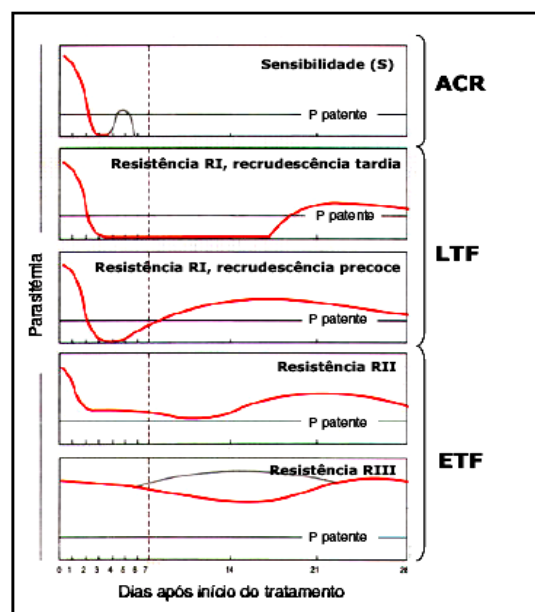


**Figura 9** - Mapa da distribuição geográfica da resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos (Adaptado de W.H.O., 2005b). ▲ - Resistência à cloroquina; ● - Resistência à sulfadoxina-pirimetamina; ■ - Resistência à mefloquina; O - Áreas sem malária; ■ - Áreas onde ocorre transmissão de malária.

### 1.8.2 - Classificação da resistência *in vivo*

O método *in vivo* é um teste de avaliação da eficácia terapêutica, ou seja, avalia a resposta do *P. falciparum* aos antimaláricos no paciente infectado. O primeiro teste *in vivo* foi desenvolvido em 1965, logo após terem surgido os primeiros casos de resistência à cloroquina. Em 1973 a OMS definiu uma classificação de resistência *in vivo* em três níveis: RI, RII, RIII e S (susceptibilidade), baseado no período de tempo que decorre entre o desaparecimento dos parasitas após o tratamento e uma recrudescência (W. H. O., 1973).

Esta classificação foi modificada em 1996 (figura 10) e reagrupada em: i) ETF (*Early Treatment Failure*) – agravamento ou persistência dos sintomas clínicos com parasitemia no decorrer dos três dias após o tratamento; ii) LTF (*Late Treatment Failure*) – reaparecimento dos sintomas com parasitemia entre o quarto e o décimo quarto dia após o tratamento; iii) ACR (*Adequate Clinical Response*) – ausência de parasitemia ou de sintomas clínicos ao décimo quarto dia após o tratamento (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).



**Figura 10** - Resposta clínica do indivíduo ao tratamento, segundo as classificações de 1973 e 1996 propostas pela OMS (*Adaptado de <http://www.malariasite.com/malaria/>*); p patente = parasitemia patente.

### I.8.3 - Factores que influenciam o aparecimento da resistência

Numerosos factores poderão influenciar o aparecimento da resistência aos antimaláricos, desde aqueles relacionados com a genética do parasita e do vector, até aos factores farmacocinéticos e farmacogenéticos. Assim, e sumariamente, podemos considerar alguns destes factores, abaixo mencionados:

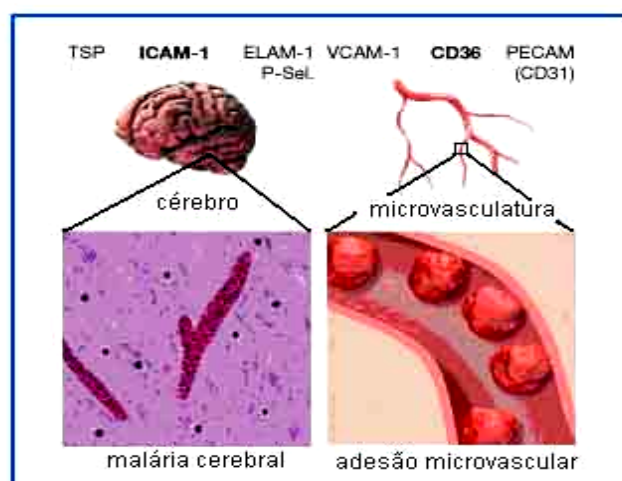
#### I.8.3.1 - Factores relacionados com o hospedeiro humano

- **Imunidade:** após um tratamento, pode permanecer uma parasitemia residual que normalmente deverá ser eliminada pelo sistema imunitário. Uma diminuição da eficiência do sistema imunitário ou uma resposta imune não específica, resulta na permanência desta parasitemia residual, e apesar do crescimento dos parasitas ser afectado quando o fármaco é absorvido, desaparece o factor de inibição e o parasita retoma o seu desenvolvimento normal, originando consequentemente uma nova geração parasitária. Esta situação contribui para a existência de uma proporção de parasitas resistentes superior à inicial, contribuindo assim, para o desenvolvimento e intensificação da resistência (White., 1997).



• **Genes de susceptibilidade à infecção malárica:** durante o curso da evolução humana surgiram, em regiões onde a malária é endêmica, alterações genéticas em alguns genes do hospedeiro, que conferiram resistência à infecção por *P. falciparum*. Esta resistência pode ser analisada individualmente, quando apenas uma minoria das infecções resulta em complicações graves, como a nível populacional, mais amplo. Por exemplo, na África Ocidental, os Fulani apresentam parasitemias consideravelmente menores que os restantes grupos que habitam a mesma região (Modiano *et al*, 1996). Compreender a base molecular destas diferenças é fundamental para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogénese da doença, e para o seu controlo, dado ser hoje possível, em programas de controlo, a manutenção de parasitemias baixas, sem sintomatologia, com estabelecimento de imunidade permanente clinicamente protectora.

Muitos dos genes associados à redução do risco de infecção desempenham funções importantes na estrutura e metabolismo do eritrócito, como acontece com as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina, com o grupo sanguíneo Duffy (FY), em *P. vivax*, com a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), entre outros. Contudo, a variabilidade na resposta do hospedeiro à infecção não se deve apenas aos *loci* com expressão eritrocitária, mas também a outros genes que codificam proteínas intervenientes noutras fases da infecção, entre os quais se destacam a molécula de adesão intercelular- 1 (ICAM-1), molécula de adesão às células vasculares (VCAM-1) e a glicoproteína IV da membrana plaquetária (receptor CD36) (figura 11).



**Figura 11** - Interação entre proteínas expressas à superfície dos eritrócitos parasitados e os receptores do hospedeiro (*Adaptado de Miller et al., 2002*).

---

Um passo crítico na infecção por *P. falciparum* é a adesão dos eritrócitos parasitados ao endotélio dos capilares de vários tecidos e órgãos, incluindo a pele, os pulmões, os músculos, o coração e o cérebro (Miller., 1994; Miller *et al.*, 2002). Este processo, conhecido por sequestro, contribui para a severidade da doença pois, para além de provocar uma oclusão microvascular local, que no cérebro parece estar associada à malária cerebral, inibe a resposta imune ao parasita ao evitar que os eritrócitos infectados sejam fagocitados no baço. O sequestro resulta da interacção entre proteínas do parasita e receptores do hospedeiro, como por exemplo a trombospondina, a molécula de adesão intercelular- 1 (ICAM-1), a molécula de adesão às células vasculares (VCAM-1) e o CD36.

●**Farmacogenética:** a metabolização dos antimaláricos pelo organismo humano varia entre os indivíduos, devido à acção de enzimas maioritariamente membros da super família dos citocromos (CYPs) P450: CYP2C19, CYP2C8, CYP3A4 e CYP3A5 (Gião *et al.*, 2001). Além de participar no metabolismo da cloroquina, amodiaquina, mefloquina e proguanil, estas enzimas também metabolizam a primaquina (CYP1A2 e CYP2D6), o artesunato (CYP2A6) e a halofantrina (CYP3A4) (Li XQ *et al.*, 2002). Vários factores podem inibir ou induzir a actividade dos CYPs P450, entre eles o polimorfismo genético, a desnutrição, a deficiência de micronutrientes, os processos infecciosos e inflamatórios e o consumo simultâneo de outros medicamentos metabolizados pela mesma via.

Os genes que codificam estas enzimas são polimórficos, originando enzimas com capacidades catalíticas variáveis resultando em cinéticas de metabolização diferentes de indivíduo para indivíduo, o que pode ser confundido com falência terapêutica. Adicionalmente, uma metabolização mais rápida do fármaco pode contribuir para a exposição do parasita à doses sub-terapêuticas, o que contribui para a não realização de uma protecção terapêutica e ao aumento do risco de resistência do parasita ao fármaco (Wernsdorfer., 1991, Vennerstrom *et al.*, 2000, White., 2004).

#### **I.8.3.2 - Factores relacionados aos fármacos antimaláricos**

● **Dosagem:** a exposição regular a doses sub-terapêuticas de antimaláricos é um dos factores mais importantes para a selecção de parasitas resistentes (Ettling *et al.*, 1995, Payne, 1988).

---

- **Resistência cruzada:** dado alguns antimaláricos terem estruturas químicas similares, com mecanismos de acção comuns, permite que a resistência a um deles automaticamente desenvolva resistência a outro antimalárico (Basco *et al.*, 1991).

- **Farmacocinética:** a concentração de antimalárico no sangue pode ser suficiente para exercer pressão selectiva sobre os parasitas, mas insuficiente para realizar uma protecção profiláctica ou terapêutica (Wernsdorfer, 1991). Um outro factor está relacionado com a terapêutica recorrendo a combinações de fármacos, com tempos de semi-vida diferentes, que pode seleccionar parasitas resistentes durante o período em que um dos fármacos já foi completamente eliminado (Watkins *et al.*, 1993).

- **Propriedades intrínsecas ao fármaco:** a qualidade do fármaco tem sido associada ao desenvolvimento e propagação de resistências aos antimaláricos e à falência terapêutica, uma vez que o manuseamento e armazenamento inadequados podem resultar numa diminuição da concentração do princípio activo do fármaco (Shakoor *et al.*, 1997; Ballereau *et al.*, 1997). Por princípio, neste grupo não se deve incluir a lamentável existência de fármacos fraudulentos, usualmente disponíveis em mercados paralelos.

#### I.8.3.3 - Factores relacionados ao parasita

- **Marcadores moleculares de resistência:** a investigação sobre marcadores moleculares parasitários é relevante para o combate à malária, sobretudo a causada por *P. falciparum*, porque: i) possibilita uma identificação de novos alvos terapêuticos, ii) estabelece novos métodos de identificação e diagnóstico da resistência aos antimaláricos, iii) permite um melhor conhecimento sobre mecanismos de susceptibilidade aos antimaláricos e, finalmente, iv) permite correlacionar dados clínicos com laboratoriais. Consequentemente, em estudos com populações, seria possível efectuar uma avaliação da frequência de “mutações resistentes” numa determinada região endémica, quando existam marcadores moleculares associados. Assumindo que exista uma correlação total (ou pelo menos elevada) entre uma determinada mutação ou mutações e a resistência a um determinado composto antimalárico, espera-se que a frequência de alelos mutantes reflecta, aproximadamente, a frequência da população parasitária fenotipicamente resistente. Por essa razão a identificação de marcadores moleculares de resistência (tabela 5) tem sido nas últimas décadas uma prioridade da investigação científica em malária.

A existência de uma ou mais mutação em determinados genes (polimorfismo) pode conferir ao parasita uma vantagem adaptativa à presença dos antimaláricos, em relação a parasitas portadores do alelo selvagem (Trotta *et al.*, 2004). Actualmente, os genes *pfdhfr* e *pfdhps* (pirimetamina e sulfadoxina) e *pfcyb* (atovaquone) são os únicos genes considerados verdadeiros marcadores moleculares de resistência. Potencialmente associados à resistência estão os genes *pfmdr1* (cloroquina, amodiaquina, mefloquina e quinino) e *pfcr1* (cloroquina). Mais recentemente foram associados os genes *pfctcp* (Walker *et al.*, 2000), *pfubp-1* (Afonso *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2007) e *pfATPase6* (Jambou *et al.*, 2005; Uhlemann *et al.*, 2005) à resposta parasitária à artemisinina. No entanto, estudos com estes marcadores nunca foram definitivamente comprovativos de associação à resistência seja clínica seja em ensaios *in vitro*.

**Tabela 5** - Marcadores moleculares associados à quimio-resistência em *P. falciparum*

Fármaco	Marcador	Associação com resistência clínica ( <i>in vivo</i> )
Cloroquina	<i>Pfcr1</i> T76	Bastante elevada
	<i>Pfmdr1</i> Y86, F184, C1034, D1042, Y1246	Ocasional
Sulfadoxina-pirimetamina	<i>pfDHFR</i> 108, 51, 59, 164 <i>pfDHPS</i> 436, 437, 540, 581, 623	Elevada ( <i>pfDHFR</i> N108 essencial para a resistência à pirimetamina. Outras mutações aumentam resistência)
Mefloquina e quinino	<i>Pfmdr1</i> 86, 184, 1034, 1042, 1246	Ocasional
Artemisinina	<i>Pfmdr1</i> 184, 1034, 1042, 1246 ? <i>PfTCTP</i> ?	Não existe resistência clínica

(Adaptado de Wongsrichanalai *et al.*, 2002)

#### I.8.4 - Multiresistência

A designação de multiresistência a antimaláricos refere-se ao fenótipo de resistência a dois ou mais fármacos, fenómeno este que tem sido observado em *P. falciparum*. Este fenótipo, pode surgir em simultâneo ou como resistência cruzada e resulta da utilização frequente e simultânea dos antimaláricos, provocando uma pressão selectiva que culmina no aparecimento do fenómeno de multiresistência. A resistência cruzada entre antimaláricos está relacionada com aspectos comuns dos seus mecanismos de acção, bem como dos mecanismos de resistência associados (Le Bras & Durand., 2003). Este fenómeno provoca graves repercussões, no controlo da malária, uma vez que reduz substancialmente a quantidade de antimaláricos disponíveis e efectivos para o combate da doença, numa dada zona endémica.

---

Geralmente, nas áreas onde há resistência a antimaláricos da classe das 4-aminoquinoleínas (especialmente a cloroquina) e aos antifolatos (especialmente à pirimetamina) e onde um terceiro fármaco já não seja eficaz considera-se estabelecido o fenómeno de multiresistência. Actualmente, a zona mais afectada pelo fenómeno de multiresistência é o Sudoeste Asiático embora na América Latina e em África haja estudos fragmentados que poderão ser conducentes a conclusão similar (Wongsrichanalai *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2003).

### **1.8.5 - Potenciais combinações terapêuticas para o tratamento da malária**

O conceito de associação terapêutica baseia-se no potencial sinérgico ou cumulativo de dois ou mais medicamentos, para melhorar a eficácia terapêutica e impedir o desenvolvimento de resistência aos componentes individuais da associação, consistindo assim no uso simultâneo de dois ou mais medicamentos com modos de acção independentes e alvos bioquímicos diferentes (Olliaro & Taylor, 2004; Sutanto *et al.*, 2004; Talisuna *et al.*, 2004). Como consequência do alastramento do fenómeno de resistência, aos antifolatos e à cloroquina, na maioria das regiões onde a malária é endémica, têm sido realizados estudos no sentido de avaliar a eficácia da utilização de novas combinações associadas de antimaláricos da classe das 4 aminoquinoleínas, tais como a cloroquina e a amodiaquina. A combinação da sulfadoxina/pirimetamina associada à amodiaquina tem sido reportada por alguns autores como sendo bastante eficaz no tratamento de malária simples (Gasasira *et al.* 2003; Aubouy *et al.*, 2003), enquanto que a combinação terapêutica da sulfadoxina/pirimetamina associada à cloroquina não tem apresentado resultados favoráveis (Basco *et al.*, 2002, Gasasira *et al.*, 2003; Bloland, 2003; Schwobel *et al.*, 2003).

Em relação a artemisinina e seus derivados, apesar da sua forte actividade antimalárica, a utilização destes em monoterapia é limitada pelo facto de apresentarem elevadas taxas de recrudescência provavelmente devido não a resistência mas ao curto tempo de semi-vida activa do fármaco. Como tal, é necessário combinar a artemisinina ou seus derivados com outros fármacos, individualmente, nomeadamente, a amodiaquina, sulfadoxina/pirimetamina, mefloquina, lumefantrina, entre outras, combinações estas que apresentam um efeito sinérgico no tratamento de infecções por *P. falciparum* (Chawira & Warhurst., 1987; Nosten & Price., 1995; W.H.O., 2006b). A combinação da artemisinina ou dos seus derivados com outros antimaláricos tem provocado grande interesse devido ao seu potencial no tratamento de *P. falciparum* (W.H.O., 2006b).

---

## **I.8.6 - Modo de acção dos antimaláricos e mecanismos de resistência associados**

Nesta secção, serão abordados os modos de acção e os mecanismos inerentes à resistência aos antimaláricos de maior relevância para este estudo, nomeadamente do grupo das quinoleínas (exceptuando a mefloquina), dos antifolatos e a artemisinina e seus derivados.

### **I.8.6.1 - Antimaláricos do grupo das quinoleínas**

O grupo de antimaláricos com maior expressão no tratamento e profilaxia da malária é o da classe das quinoleínas, nomeadamente, o quinino, a mefloquina, a cloroquina e a amodiaquina. Apesar dos mecanismos de acção ainda não se encontrarem completamente esclarecidos, pela similaridade entre a estrutura química destes fármacos, pensa-se que existirão factores comuns relacionados aos mecanismos de resistência.

#### **I.8.6.1.1 - Cloroquina**

A cloroquina (CQ) é uma 4-aminoquinolina quimicamente derivada do quinino, sintetizada na Alemanha durante a segunda Guerra Mundial. Foi considerado, durante muito tempo, o fármaco de primeira linha no tratamento da malária não grave, até ao aparecimento dos primeiros relatos de resistência, nos finais dos anos 50. No entanto, principalmente em algumas regiões de África este fármaco continua a ser frequentemente utilizado.

##### **● Mecanismo de acção da cloroquina**

O mecanismo de acção da CQ baseia-se na interferência do fármaco no mecanismo de digestão da hemoglobina por parte dos parasitas. O *P. falciparum* digere hemoglobina dentro do seu vacúolo digestivo onde a proteólise desta proteína resulta na formação de um produto denominado hemo ou ferriprotoporfirina IX (FPXI). A FPXI é altamente tóxica para o parasita causando um aumento da permeabilidade das membranas e conduzindo eventualmente à lise celular (Slater *et al.*, 1991). Por esta razão, o parasita possui um mecanismo enzimático de destoxificação celular, que consiste na polimerização da FPXI num cristal inerte (hemozoína). A CQ actua por acumulação em concentrações elevadas no vacúolo digestivo do parasita, podendo atingir mais de 100 vezes as do plasma (Gligorijevic *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 1998), onde impede a formação de hemozoína e

---

consequentemente a destoxificação da FPXI, originando a morte dos parasitas (Zhang *et al.*, 1999; Ginsburg., 1999).

### ● Mecanismo de resistência à cloroquina

A resistência do *P. falciparum* à CQ parece estar associada a um aumento da capacidade do parasita para expelir o fármaco ocorrendo numa taxa que não permite atingir os níveis necessários para inibir a polimerização do grupo heme (Foley *et al.*, 1997). Este fluxo de fármaco ocorre a uma taxa 40 a 50 vezes superior, em parasitas resistentes, relativamente a parasitas sensíveis, resultando numa menor acumulação de fármaco em parasitas resistentes (Krogstad *et al.*, 1992, Peel, 2001). A cinética de importação deste fármaco foi associada ao fenótipo de resistência à CQ, no cruzamento entre clones (Wellems *et al.*, 1990).

Dois genes, presentes na membrana do vacúolo digestivo do parasita (local de actuação da CQ), têm sido alvo de inúmeros estudos: os genes *pfmdr1* e o *pfcr1*. Um trabalho de transfecção genética pareceu indicar que mutações pontuais no gene *pfmdr1*, codificando alterações nos aminoácidos 1034, 1042 e 1246, podem modular a sensibilidade à CQ (Reed *et al.*, 2000). No entanto, a associação entre o gene *pfmdr1* e a resistência à cloroquina não está completamente esclarecida e é controversa. Alguns estudos com isolados provenientes de várias áreas geográficas da Ásia e África indicam existir uma correlação positiva entre a mutação *pfmdr1* N86Y e a resistência à CQ (Gomez-Saladin *et al.*, 1999; Nagesha *et al.*, 2001; Ngo *et al.*, 2003; Cojean *et al.*, 2006; Duah *et al.*, 2007).

Em isolados provenientes do Brasil foi verificada uma associação entre os polimorfismos *pfmdr1* N1042D e *pfmdr1* D1246Y e a resistência *in vitro* à CQ (Póvoa *et al.*, 1998). O gene *pfcr1* codifica uma proteína transmembranar, localizada no vacúolo digestivo do parasita. Este gene pode apresentar entre 6 a 8 mutações pontuais que podem modular os níveis de susceptibilidade da cloroquina, incluindo uma que aparentemente desempenha um papel fundamental na resistência à cloroquina, a *pfcr1* K76T (Severini *et al.*, 2006).

Mutações pontuais neste gene, em particular a mutação *pfcr1* K76T, têm sido associadas com a resistência do *P. falciparum* à CQ *in vitro* e *in vivo* em isolados provenientes de África, Sudeste Asiático e América do Sul (Adagu & Warhurst., 2001; Djimde *et al.*, 2001; Labbé *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2002; Ochong *et al.*, 2003; Huaman *et al.*, 2004; Plummer *et al.*, 2004; Hatabu *et al.*, 2005; Sarr *et al.*, 2005; Cojean *et al.*, 2006; Menard *et al.*, 2006; Duah *et al.*, 2007; Ojurongbe *et al.*, 2007; Ursing *et al.*, 2007). Contudo, outros estudos demonstram existir uma fraca ou não existir

---

associação entre a mutação K76T do gene *pfcr* e a resistência à CQ *in vivo* e *in vitro* (Talisuna *et al.*, 2002; Kyosiimire-Lugemwa *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002; Daily *et al.*, 2003).

#### **I.8.6.1.2 - Amodiaquina**

A amodiaquina (AMQ) é uma 4-aminoquinoleína com uma estrutura química muito semelhante à cloroquina também muito utilizada no tratamento de malária não grave. Em algumas áreas endêmicas, em África, é considerada como uma das últimas alternativas economicamente viáveis à cloroquina, tendo sido utilizada como monoterapia durante muitos anos (Aubouy *et al.*, 2003; Barennes *et al.*, 2004). Esta quinoleína constitui um bom fármaco para utilização em associações terapêuticas (Molta *et al.*, 2003; Barennes *et al.*, 2004; Checchi *et al.*, 2004; Talisuna *et al.*, 2004 c), sendo considerado como um medicamento valioso na combinação com os ACTs embora algumas informações disponíveis sugiram um certo grau de resistência cruzada com a CQ (Adjuik *et al.*, 2002, Olliaro & Mussano, 2003). No entanto, a amodiaquina, principalmente em crianças, pode apresentar alguns efeitos colaterais adversos (Adónis-Koffy *et al.*, 2003).

##### **• Mecanismo de acção da amodiaquina**

Pela similaridade da estrutura química apresentada entre a amodiaquina e a cloroquina, tem sido assumido que os mecanismos de acção possam apresentar moléculas e/ou vias metabólicas alvo comuns a ambos. Está estabelecido que tal como a cloroquina, a amodiaquina é acumulada no vacúolo digestivo do parasita inibindo a polimerização dos grupos heme, aumentando o seu fluxo para fora do vacúolo. Esta quinoleína inibe ainda a degradação dos grupos heme efectuada pela glutatona, o que permite que este se acumule na membrana do parasita (Ginsburg *et al.*, 1998).

##### **• Mecanismo de resistência à amodiaquina**

O mecanismo de resistência à AMQ não é conhecido, mas devido à sua semelhança com a CQ assumiu-se que os mecanismos de resistência do parasita a estes dois antimaláricos apresentem vários aspectos em comum (Ochong *et al.*, 2003). Existem evidências da implicação de mutações pontuais nos genes *pfcr* e *pfmdr1* na resistência *in vivo* a esta quinoleína. Alguns estudos associam a resistência *in vivo* à amodiaquina com a mutação *pfcr* K76T (Ochong *et al.*, 2003; Dokomajilar *et al.*, 2006; Ursing *et al.*, 2007), outros associam-na com as mutações *pfmdr1* N86Y e *pfmdr1*



---

D1246Y (Dokomajilar *et al.*, 2006; Holmgren *et al.*, 2007; Nsobyia *et al.*, 2007), e alguns parecem indicar que resistência *in vivo* à amodiaquina se relaciona com a presença de mutações em ambos genes [*pfprt* K76T e *pfmdr1* N86Y (Happi *et al.*, 2006)]. No entanto, estes resultados são controversos. Um estudo recente realizado no Quênia indicou que a resistência *in vivo* à amodiaquina não está relacionada com a amplificação do gene *pfmdr1* (Holmgren *et al.*, 2006).

Por outro lado, um outro estudo recente (Tinto *et al.*, 2008), realizado no Burkina Faso, onde se investigou a relação entre os dois principais marcadores moleculares de resistência à CQ (*pfprt*76T e *pfmdr1* 86Y) com a eficácia clínica da AMQ, mostrou que a prevalência de *pfprt* 76T e *pfmdr1* 86Y ou ambas mutações na mesma infecção foi significativamente mais elevada em pacientes que tiveram recrudescência do que naqueles que responderam ao tratamento. Esta observação mostra a utilidade destes dois marcadores moleculares para monitorização da resistência à AMQ, principalmente nos países onde este medicamento é utilizado em combinação com o artesunato, como primeira ou segunda linha de tratamento para a malária.

#### **I.8.6.1.3 - Quinino**

O quinino (QN) é um alcalóide derivado da casca da Cinchona usado na prática clínica há mais de 350 anos. Em 1820, o quinino foi isolado por Pierre Pelletier e Joseph Caventou e, em 1944, foi sintetizado pela primeira vez em laboratório (Frédérich *et al.*, 2002).

Apesar do seu longo tempo de utilização o QN continua eficaz no tratamento de todas as espécies que provocam malária humana e raramente se verificam elevados níveis de resistência *in vivo*. Devido à sua posologia e aos problemáticos efeitos secundários, não pode ser considerado como uma alternativa viável aos antimaláricos de primeira linha, no tratamento de malária não grave. Continuará, no entanto, a ser o fármaco de eleição como primeira linha, no tratamento de malária grave ou em casos de multi-resistência (Roche *et al.*, 2003), embora existam países em que o mesmo é utilizado mais liberalmente por falta de vigilância na utilização de fármacos e na sua aquisição descontrolada.

##### **• Mecanismo de acção do quinino**

O seu mecanismo de acção ainda não está totalmente esclarecido. O quinino actua, principalmente, a nível das fases intra eritrocitárias assexuadas de *Plasmodium*. Tem sido assumido que este composto interfere com o mecanismo de digestão da hemoglobina efectuada pelo parasita (Geary *et al.*, 1986). Alguns estudos parecem associar o quinino à inibição do processo de ingestão

---

da hemoglobina, por parte do parasita, a partir da célula hospedeira (Famin & Ginsburg, 2002), processo fundamental à sobrevivência do *Plasmodium*, uma vez que a hemoglobina representa para o parasita a fonte de aminoácidos necessária ao seu desenvolvimento.

#### ● Mecanismo de resistência ao quinino

O mecanismo de resistência ao quinino tem sido associado à presença de mutações e/ou alteração na expressão do gene *pfmdr1* (Reed *et al.*, 2000; Ward & Bray, 2000; Ferdig *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2005; Duraisingh *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2006). Existem algumas evidências de que alteração do número de cópias e dos níveis de expressão do gene *pfmdr1*, podem influenciar a diminuição da susceptibilidade ao quinino (Ferdig *et al.*, 2004; Burke *et al.*, 2003; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Estudos de transfecção demonstraram que mutações no gene *pfmdr1*, nos codões 1034, 1042 e 1246, podem estar associadas à resistência ao quinino em várias linhas parasitárias (Reed *et al.*, 2000; Ward & Bray, 2000). Um estudo realizado por Ferdig, demonstrou que os cromossomos 5, 7 e 13 contêm genes que potencialmente contribuem para as variações na resposta do *P. falciparum* ao quinino (Ferdig *et al.*, 2004). Na sequência deste estudo, foi implicado um transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (PfNHE) na resistência ao quinino tendo-se verificado que a sua actividade se encontrava aumentada nas estirpes resistentes ao quinino relativamente a estirpes sensíveis (Bennett *et al.*, 2007).

Em pesquisas de genes e/ou transportadores associados à resistência a antimaláricos, o gene *pfprt* foi identificado como um dos genes envolvido na resposta ao quinino, sendo as suas mutações consideradas um factor necessário mas não suficiente para justificar a capacidade do parasita para resistir a este fármaco (Mu *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2002; Ferdig *et al.*, 2004).

#### I.8.6.2 - Antimaláricos do grupo dos antifolatos

O fármaco, desta classe, considerado mais eficiente, com menos efeitos secundários, baixa toxicidade e consequentemente o mais utilizado, foi a pirimetamina, a qual foi introduzida como antimalárico, em 1952. A combinação sulfadoxina/pirimetamina (S/P) foi introduzida para o tratamento de *P. falciparum* de um modo globalizado durante os anos 60. Contudo, rapidamente surgiram os primeiros casos publicados de resistência na fronteira entre a Tailândia e a Camboja (Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Existem, actualmente, níveis elevados de resistência a este composto, em grande parte do sudoeste Asiático, sul da China e Amazonas. A resistência à S/P só

---

atingiu o continente Africano nos anos 80, contudo, esta tem vindo a aumentar com o aumento da sua utilização (Wongsrichanalai *et al.*, 2002).

Actualmente, um certo número de países continuam a usar a S/P isoladamente ou em combinação para o tratamento da malária simples, quer como política nacional ou através da distribuição pelo sector privado. Adicionalmente, a S/P é actualmente a única opção segura para o tratamento intermitente da malária na gravidez (TIP), uma das principais intervenções promovidas pela Programa Global da Malária (OMS) para reduzir o baixo peso ao nascer, relacionado com a malária, nas áreas endémicas.

Recentemente, a S/P tem sido associada a redução da malária na infância e, em alguns estudos, à anemia, quando administrado para o tratamento preventivo intermitente da malária em crianças (TIPi) (Chandramohan *et al.*, 2005, Macete *et al.*, 2006, Schellenberg *et al.*, 2001) ou em crianças com menos de cinco anos de idade, quando administrado em combinação com artesunato (Cisse *et al.*, 2006).

#### ●Mecanismo de acção da sulfadoxina/pirimetamina

Estes dois fármacos actuam sinergicamente como inibidores da biossíntese dos folatos, essencial para o parasita, uma vez que este é incapaz de obter as pirimidinas a partir do seu hospedeiro (Ferone, 1977). O folato é um co-factor essencial em várias reacções de transferência de carbono, especialmente na biosíntese da dihidrofolato reductase (*dhfr*) e timidilato sintetase (*ts*), que catalisam a síntese de timidina monofosfato (dTMP). O *Plasmodium* tem a capacidade de sintetizar este composto, no entanto, nesta síntese na reacção de conjugação da pteridina com PABA, o parasita necessita da enzima *dhps* activa, uma condição essencial para a síntese de ácido fólico (Quellette, 2001). A pirimetamina é um antagonista dos folatos, inibindo a enzima *dhfr* e causando a depleção de tetrahydrofolato. Assim, a pirimetamina liga-se à enzima *dhfr-ts* provocando por um lado um decréscimo na síntese de pirimidinas e consequente inibição da replicação de DNA, e por outro a diminuição da síntese de metionina e redução da conversão da glicina em serina. A sulfadoxina é uma sulfonamida que actua por inibição da enzima dihidropteroato sintetase (*dhps*), evitando a formação do dihidropteroato (Frédérich *et al.*, 2002).

#### ●Mecanismo de resistência à sulfadoxina/pirimetamina

A resistência à sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®) é um dos poucos exemplos de um mecanismo bem conhecido, surgindo pela presença de mutações pontuais nas regiões codificantes

---

do centro activo das enzimas *dhfr* e *dhps*. Foi demonstrado, através de estudos em *P. falciparum* e modelos murinos de malária, que a resistência à S/P surge pela presença de mutações pontuais nas regiões codificantes do centro activo das enzimas *dhfr-ts* e *dhps* (Foote *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1988; Carlton *et al.*, 2001; Wongsrichanalai *et al.*, 2002). Estão descritas 4 mutações pontuais no gene da *dhfr* associadas à resistência à pirimetamina: 108N, 51I, 59R e 164L e pensa-se que estas mutações se acumulam de um modo sequencial, iniciando-se com a 108N (Sirawaraporn *et al.*, 1997). Geralmente, a mutação no gene *pfdhfr*, no códon 108 (S108N), parece ser suficiente para conferir resistência à pirimetamina e consequentemente à S/P (Sibley *et al.*, 2001), sendo esta a principal mutação associada com a resistência e a única encontrada isoladamente em populações naturais. O facto de uma única mutação ser suficiente para alterar a susceptibilidade a este fármaco explica a razão pela qual a resistência do parasita a este composto tenha surgido imediatamente após a generalização do seu uso, como terapêutica da malária (Cravo & Rosário., 2002).

Apesar de mutações pontuais nos códões 436, 437, 540 e 613 no gene *pfdhps* estarem associadas à resistência à sulfadoxina (Brooks *et al.*, 1994; Triglia & Cowman, 1994), estudos mostram que a presença de apenas duas mutações em *pfdhps* (437 e 540) é suficiente para se considerar como um pré-requisito para a resistência às sulfonamidas (Sirawaraporn *et al.*, 1997, Mugittu *et al.*, 2004). Um factor provavelmente relacionado com a emergência de mutações relacionadas aos antifolatos pode ser o uso amplamente disseminado do Cotrimoxazol ou Bactrim™ (trimetopim+sulfametoxazol), cujo mecanismo de acção antimicrobiana é através da inibição das mesmas enzimas envolvidas na biosíntese do ácido fólico, principalmente para a prevenção das infecções oportunistas associadas ao VIH (Iyer *et al.*, 2001; Thera *et al.*, 2005). Um outro factor pode estar ligado às diferenças existentes entre as várias formulações de Cotrimoxazol, disponíveis no mercado paralelo, que podem ter uma biodisponibilidade e valores terapêuticos diferentes.

Mutações nos codões 16, 51, 59, 108 e 164 em *pfdhfr* e 436, 437, 540, 581 e 613 em *pfdhps* têm sido referidas como predictivas no desenvolvimento de resistência à sulfadoxina/pirimetamina (Schmider *et al.*, 2003), sendo que o conjunto das mutações 108N, 51I, 59R no gene *pfdhfr* e 437G e 540E no gene *pfdhps*, designado de quintuplo mutante, tem sido considerado como marcador molecular para a falência terapêutica observada no tratamento de *P. falciparum* com S/P (Nzila *et al.*, 2000; Jafari *et al.*, 2003; Bwijo *et al.*, 2003). Estes achados têm sido confirmados por estudos mais recentes acerca da falência terapêutica à S/P, quando utilizada em monoterapia, na análise das mutações em *pfdhfr* e *pfdhps*, em crianças menores de cinco anos com malária não complicada (Ndounga *et al.*, 2007). Estudos realizados no Senegal mostraram a associação do quintuplo mutante com a falência terapêutica a S/P, naquele País (Nzila *et al.*, 2000, Kublin *et al.*, 2002, Ndiaye *et al.*, 2005, Ndiaye *et al.*, 2006) que, segundo outros autores, confirma a invasão dos alelos

---

*pfdhfr* e *pfdhps*, observada na África Oriental, com a invasão do triplo mutante *pfdhfr* precedendo a invasão pelo duplo mutante em *pfdhps* (A437G e K540E) (Kublin *et al.*, 2002, Roper *et al.*, 2003).

No entanto, a utilização destas mutações como marcadores moleculares de resistência à pirimetamina e sulfadoxina permanece controversa, uma vez que algumas investigações não estabelecem nenhuma associação com o resultado do tratamento (Rallon *et al.*, 1999, Jelinek *et al.*, 1997). Adicionalmente, existem outras mutações no gene *pfdhfr* que necessitam ser analisadas em relação ao seu papel na resistência *in vivo* (Hankins *et al.*, 2001). Por outro lado, existem outros factores relacionados com a falência ao tratamento com a S/P, como por exemplo a densidade parasitária (>100,000 µl de sangue) e a idade dos indivíduos em estudo (Dorsey *et al.*, 2000, Basco *et al.*, 2000, White, 2002; Sowunmi *et al.*, 2004; Happi *et al.*, 2005).

No que respeita a mutação *pfdhfr* 164 Leu, esta foi detectada no Distrito Muheza na Tanzânia, uma área com elevada resistência S/P, utilizando ensaios de expressão em leveduras (Hastings *et al.*, 2002). Contudo, usando as técnicas de PCR-RFLP e/ou sequenciação, esta mutação não foi identificada nesta área ou em outras áreas em África (Wichmann *et al.*, 2003, Bwijo *et al.*, 2003). Este facto sugere que o alelo mutante *pfdhfr* 164 Leu, detectado na Tanzânia, pode representar apenas um “baseline” normal de uma mutação não-funcional do gene *pfdhfr*, que ocorre naturalmente durante a replicação de DNA (Ochong *et al.*, 2003, Wichmann *et al.*, 2003). Por outro lado, é interessante referir que em estudos recentes realizados no Quênia (Hamel *et al.*, 2008), Uganda e Malawi (Staedke *et al.*, 2004, Alker *et al.*, 2005, McCollum *et al.*, 2006) foi demonstrada a presença da mutação *pfdhfr* 164L, tendo a associação desta ao triplo mutante sido reportada no Quênia (McCollum *et al.*, 2006).

Um estudo realizado em pacientes adultos, no Quênia (Hamel *et al.*, 2008), cujo o objectivo foi a identificação da mutação *pfdhfr* 164L, durante seis meses de seguimento, demonstrou a existência desta associada a outras combinações de genótipos, nomeadamente com o triplo mutante (S108N, N51I e C59R) e com um duplo mutante (108N e N51I) e o alelo selvagem 59C. No entanto, este estudo não estabeleceu uma relação entre a falência ao tratamento com S/P e a presença da mutação I164L. Estes achados indicam que o estabelecimento da mutação I164L poderia agravar a situação económica e de saúde em África uma vez que a propagação da mesma poderia ameaçar seriamente as intervenções terapêuticas neste continente.

Algumas mutações à S/P, encontradas em África, não têm sido identificadas em outros continentes como por exemplo na Ásia e na América do Sul. Importa referir que algumas dessas mutações são prevalentes no Sudoeste Asiático e na América do Sul (Wang *et al.*, 1997) onde se pensa terem contribuído para a rápida propagação da resistência aos antifolatos nesses continentes. Este facto sugere uma possível origem evolucionária diferente das populações parasitárias.

---

### **1.8.6.3 - Artemisinina e seus derivados**

A artemisinina é o composto activo da planta *Artemisia annua L*, utilizada na medicina tradicional chinesa como antipirético desde há 1500 anos. A artemisinina foi isolada por cientistas chineses em 1971, tendo sido a sua estrutura determinada em 1979 e a sua síntese total realizada em 1983 (Frédérich *et al.*, 2002). Este grupo de antimaláricos induz uma resposta clínica e uma redução da parasitémia mais rápida que todos os outros fármacos existentes (Hien & White, 1993), actuando com elevada eficácia nas várias fases sanguíneas do parasita, diminuindo o número de gametócitos no sangue e a infectividade dos gametócitos sobreviventes. A artemisinina tem baixa solubilidade em água e em óleo, o que limita as possíveis vias de administração, tendo sido por este motivo desenvolvidos vários derivados semi-sintéticos, nomeadamente o artesunato que é hidrossolúvel e os derivados lipossolúveis como o artemeter e arteeter. Outro derivado semi-sintético, artemisona, está em fase de ensaios clínicos, e parece ser o mais potente (Haynes *et al.*, 2006; Vivas *et al.*, 2007). Estes compostos são metabolizados em dihidroartemisinina que é o metabólito biologicamente activo. Existem três factores que podem estar associados ao facto de não existir resistência clínica a este fármaco, nomeadamente: i) são normalmente utilizados em combinação com outros fármacos; ii) apresentam actividade gametocítica o que inibe a transmissão de estirpes resistentes; iii) são fármacos com tempos de semi-vida curtos, (Ittarat *et al.*, 2003), de aproximadamente 3 a 5 horas (Robert *et al.*, 2001).

Actualmente, combinações à base da artemisinina (ACTs) têm sido propostas como principal política de tratamento em resposta ao aumento da resistência às monoterapias mais comuns. Entre as várias combinações utilizadas, o Coartem<sup>TM</sup>, uma combinação do artemeter associado à lumefantrina, é presentemente o medicamento de escolha como primeira e segunda linha de tratamento da malária em vários países africanos.

#### **● Mecanismo de acção da artemisinina e seus derivados**

O mecanismo de acção da artemisinina e derivados não é completamente conhecido. Um dos potenciais modos de acção tem sido atribuído à sua capacidade de gerar radicais livres devido à ponte endoperóxido presente em todas as moléculas de artemisinina e seus derivados (Robert *et al.*, 2001). Para exercerem a sua actividade é necessário um passo de activação, ou seja a clivagem da ponte endoperóxido. É proposto que essa ponte seja clivada pelo grupo heme intra-parasitário ou Fe<sup>2+</sup>, o que leva à formação dum radical livre que funcionará como um agente alquilante que irá reagir com o grupo heme e proteínas parasitárias (Meshnick, 2002). São os radicais livres do

---

fármaco, que apresentam actividade antimalárica provocando a alquilação das proteínas do parasita e consequentemente a sua morte (Meshnick., 2002; Pandey *et al.*, 1999; Delhaes *et al.*, 2000). Outra forma de acção destes antimaláricos é a inibição da actividade proteolítica no vacúolo digestivo do parasita, provocada pelos radicais da artemisinina, o que resulta numa acumulação de hemoglobina, em parasitas tratados com este fármaco (Pandey *et al.*, 1999; Meshnick, 2002). Outro mecanismo de acção, proposto por Eckstein-Ludwig e colaboradores, está baseado na alteração do armazenamento intracelular de cálcio através da inibição da actividade da enzima ATPaseCa<sup>2+</sup> do *Plasmodium*, codificada pelo gene *pfATPase6* (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003). A artemisinina possui uma estrutura semelhante à taspigargina, um inibidor específico da enzima retículo sarco/endoplasmático Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA). Deste modo foi colocada a hipótese que a artemisinina, depois de activada, se comportasse como um inibidor específico da SERCA do *P. falciparum* (Eckstein-Ludwig *et al.*, 2003).

#### ● Mecanismo de resistência à artemisinina e seus derivados

Apesar de não existirem resistências clínicas à artemisinina reportadas, alguns estudos realizados demonstraram uma diminuição de susceptibilidade e recrudescências, após monoterapia, que se devem, provavelmente, a factores farmacológicos (ex: metabolização do fármaco) e não propriamente a falência terapêutica devida à resistência do parasita a este antimalárico (Meshnick, 2002). No entanto, os genes *pfcr1*, *pfmdr1*, *pfctcp*, *pfubp-1* e *pfATPase6*, têm sido investigados no contexto da modulação da susceptibilidade à artemisinina e seus derivados. Em relação ao gene *pfcr1*, estudos de transfecção genética demonstraram que determinadas mutações no gene *pfcr1* aumentam a susceptibilidade a esta classe de antimaláricos, especificamente à artemisinina e dihidroartemisinina (Sidhu *et al.*, 2002). No entanto, a sua importância em populações naturais da *P. falciparum* não foi confirmada (Jambou *et al.*, 2005). O gene *pfmdr1* tem sido relacionado com a resistência a vários antimaláricos, como cloroquina, amodiaquina, mefloquina e artemisinina e seus derivados. No caso específico da artemisinina e seus derivados, parece existir uma forte associação entre amplificação do gene *pfmdr1*, a forma selvagem do gene e a resistência aos derivados da artemisinina em populações naturais de *P. falciparum*, suportado por estudos genéticos (Ferrer-Rodríguez *et al.*, 2004; Duraisingh & Cowman, 2005).

O gene *pfctcp* codifica uma proteína homóloga da TCTP (*translationally controlled tumor protein*) em *P. falciparum*. O envolvimento deste gene na resistência à artemisinina e seus derivados foi pressuposto após a realização dum estudo com estirpes de *P. yoelli* resistentes à artemisinina seleccionadas a partir de progenitores sensíveis, em que estas apresentaram uma

---

quantidade significativamente maior de TCTP relativamente às estirpes parentais sensíveis (Walker *et al.*, 2000). Contudo o fenótipo de resistência demonstrou ser instável, o que não permitiu estabelecer uma relação inequívoca entre o gene *pftctp* e o fenómeno de resistência. O gene *pfubp-1* codifica uma protease ubiquitina-específica, em *P. falciparum* (UBP-1). Um estudo realizado em estirpes de *Plasmodium chabaudi chabaudi* com resistência à artemisinina geneticamente estável, (Afonso *et al.*, 2006) sugeriu este gene como potencial modulador da susceptibilidade às artemisininas, tendo sido identificada no clone resistente ao artesunato uma mutação V739F, no gene ortólogo de *pfubp-1* em *P. chabaudi* (Hunt *et al.*, 2007). No entanto, a pesquisa dessa mutação em duas linhas de *P. falciparum* com baixa susceptibilidade à artemisinina, revelou a sua inexistência (Hunt *et al.*, 2007).

A teoria mais consistente sobre o mecanismo que pode modular a susceptibilidade da artemisinina está ligada ao gene *pfATPase6*, onde estudos realizados por Uhlemann e colaboradores (Uhlemann *et al.*, 2005) demonstraram que mutações em aminoácidos da proteína PfATPase6 modulam a susceptibilidade *in vitro* à artemisinina. Recentemente, foi identificada uma mutação, S769N, no gene *pfATPase6* em 6 de 7 isolados da Guiana Francesa, com reduzida susceptibilidade *in vitro* ao artemeter: esses isolados apresentavam uma média de valores de IC50 20 vezes superior ao valor máximo apresentado pelos outros isolados estudados. Foi sugerido que esta mutação evita que os derivados da artemisinina interfiram nas alterações da conformação da proteína necessárias para a sua actividade (Jambou *et al.*, 2005). Esta descoberta veio reforçar a ideia de que a proteína PfATPase6 estará envolvida na resistência à artemisinina e derivados.



---

## I.9 – Objectivos

Inserido no contexto da problemática da resistência aos antimaláricos, em Moçambique, este trabalho teve como finalidade investigar diversos aspectos ligados ao quadro clínico da malária, ao genótipo de resistência aos antimaláricos, em *Plasmodium falciparum*, à farmacogenética e aos marcadores de susceptibilidade/resistência do hospedeiro. Para tal, foram contemplados os seguintes objectivos científicos específicos, com o objectivo final de os aplicar, quando possível, ao trabalho em curso clínico e de investigação no País:

- **Identificação das espécies de plasmódios e determinação das parasitémias.**
- **Caracterização das formas clínicas de malária nos pacientes do estudo.**
- **Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos** (genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfprt* e *pfATPase6*)
  - Identificação de polimorfismos genéticos;
  - Determinação da frequência alélica dos polimorfismos nos genes estudados;
  - Determinação da frequência alélica de mutações múltiplas nos genes *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfmdr1*;
  - Análise da selecção de alelos mutantes nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*.
- **Estudo dos marcadores moleculares do hospedeiro relacionados com susceptibilidade/resistência à malária**
  - Análise de mutações nos genes *ICAM-1* e *CD36*
- **Estudo de factores genéticos humanos associados a metabolismo de fármacos antimaláricos.**
  - Análise das variantes polimórficas do citocromo P450 (CYP2C8)

---

## **CAPÍTULO II**

## II – MATERIAL E MÉTODOS

Para facilitar a apresentação, este capítulo será dividido em 3 secções:

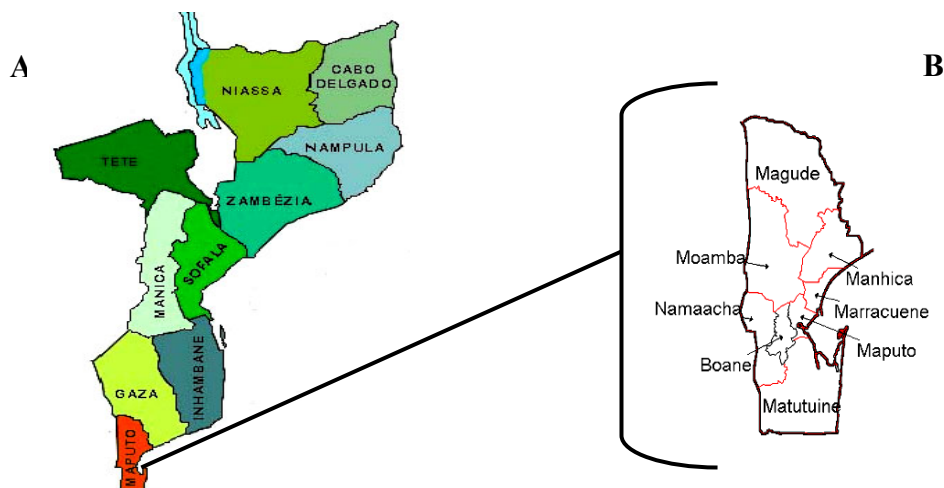
II.1 - Locais de realização do estudo.

II.2 - Material biológico.

II.3 - Metodologia.

### II.1 - Locais de realização do estudo

O trabalho no terreno foi efectuado em três unidades sanitárias (US) (Hospital Central de Maputo, Centro de Saúde de Bagamoyo e Centro de Saúde de Boane), da província de Maputo, capital de Moçambique (figura 12). O trabalho laboratorial foi efectuado em colaboração com três instituições Portuguesas nomeadamente no laboratório do Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais LA/IHMT, Lisboa, Portugal, para o estudo de resistências aos antimaláricos; no Centro de Biomedicina Estrutural e Molecular da Universidade do Algarve, Portugal, para estudo dos factores genéticos do humanos relacionados ao metabolismo de fármacos antimaláricos; e no Instituto de Patologia molecular e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP), Portugal, para o estudo dos marcadores moleculares do hospedeiro relacionados com a susceptibilidade/resistência à malária.



**Figura 12** - Mapa de Moçambique (A) e da província de Maputo (B) (*Adaptado de [www.ine.gov.mz/](http://www.ine.gov.mz/)*).

## II.2- Material biológico

### II.2.1 – Clones de referência de *Plasmodium falciparum*

Neste trabalho, foram utilizados clones de *P. falciparum*, previamente caracterizados a nível do genótipo e do fenótipo, quanto à resposta a antimaláricos, armazenados na colecção crio-preservada do Laboratório da UEI Malária/Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais LA/IHMT, Lisboa, Portugal. Os clones de referência utilizados foram os seguintes: HB3, 3D7 e Dd2 (tabela 6).

**Tabela 6** - Clones de referência de *P. falciparum* 3D7, Dd2, HB3, K1 e N3

Clone	Origem	Referência	Fenótipo	
			S	R
HB3	Honduras	(Hirawake <i>et al.</i> , 1997)	CQ, Mef e QN	-
3D7	?	(Walliker <i>et al.</i> , 1987)	CQ, Mef e QN	-
Dd2	Indochina	(Odula <i>et al.</i> , 1988)	-	CQ, Mef e QN
K1	Tailândia	(Bhasin & Trager, 1984)	Mef e QN	CQ
N3	São Tomé e Príncipe	(Cravo <i>et al.</i> , 2004)	-	SD

CQ – cloroquina, Mef – mefloquina, SD – Sulfadoxina, QN – quinino, S - sensível, R – resistente, ? – Clone cuja proveniência geográfica não está identificada.

### II.2.2 - Isolados de sangue

Todos os isolados de sangue deste estudo foram provenientes de pacientes observados nas unidades sanitárias citadas em II.1. Os isolados foram obtidos para cada paciente em dois momentos, nomeadamente antes do tratamento para os pacientes com malária grave e/ou complicada e, antes e depois do tratamento para os pacientes com malária não complicada.

#### II.2.2.1 - Colheita e armazenamento dos isolados de sangue

A colheita dos isolados de sangue foi efectuada pelo profissional de saúde da unidade sanitária, para a realização de exames laboratoriais aos pacientes com sintomatologia clínica de malária. Do volume total de sangue obtido, cerca de 50 – 100 µl foram colocados em papel de filtro

---

Whatman nº 4, identificados, secos à temperatura ambiente e posteriormente acondicionados em embalagens plásticas individuais. Os isolados de sangue em papel de filtro foram armazenadas à temperatura ambiente, para posterior tratamento no laboratório do CMDT LA/IHMT, Lisboa, Portugal. A partir do mesmo sangue foram efectuados uma gota espessa e um esfregaço sanguíneo por isolado, em lâminas microscópicas que foram posteriormente observadas no laboratório de Biologia Celular/Histologia&Embriologia da Faculdade de Medicina da UEM, Maputo, Moçambique.

### **II.2.3 – Amostras de mucosa oral**

As amostras de mucosa oral foram obtidas de crianças saudáveis que compareceram ao Centro de Saúde de Bagamoyo, em Maputo, por razões de vária ordem (ex: controle do peso, realização da vacinação).

#### **II.2.3.1 - Colheita e armazenamento de amostras de mucosa oral**

A colheita de amostras de mucosa oral foi efectuada, pela investigadora do estudo, através de uma “raspagem” suave da mucosa oral utilizando uma pequena escova de cerdas macias. As amostras foram conservadas em tubos de micro-centrífuga, de 1,5ml contendo álcool etílico (90-100%) para posterior análise no IPATIMUP, Porto, Portugal.

### **II.3 - Metodologia**

Todos os indivíduos foram sujeitos a um questionário (anexo 3) de forma a se obterem informações acerca do perfil individual, dos episódios anteriores de malária e do uso de antimaláricos, para além de outras informações relevantes como o quadro clínico, o diagnóstico e o tratamento. Foram critérios de inclusão os seguintes: i) não toma de qualquer antimalárico até 2 semanas antes do estudo; ii) consentimento informado por parte dos pais, tutores ou acompanhantes das crianças, para participar no estudo; iii) presença de sintomatologia que indicasse suspeita infecção malárica (ex: febre, calafrios, convulsões, cefaleias).

Uma vez que se tratava de indivíduos menores de idade, foi explicado ao seu acompanhante os objectivos do trabalho e obtido consentimento informado (anexo 4). Para este estudo foi obtida autorização do Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS)/MISAU, em Moçambique.

---

### **II.3.1-Exame clínico dos pacientes do estudo**

O exame clínico dos pacientes foi realizado, por profissionais de saúde (médicos, técnicos ou enfermeiros) das US referidas em II.1, no dia de admissão hospitalar e no dia do controlo. O exame clínico foi sempre acompanhado pela investigadora do estudo e consistiu numa anamnese, para o registo das queixas referidas pelo paciente ou acompanhante e num exame físico completo que incluiu a avaliação dos sinais vitais e de todos aparelhos e sistemas do organismo. Sempre que necessário, no caso de presença de sinais de potencial gravidade (ex: convulsões, vómitos), o profissional de saúde realizava procedimentos terapêuticos segundo normas existentes no serviço. Após o tratamento dos pacientes, na US, estes recebiam indicação para regressarem ao controlo. A indicação da data do controlo variou segundo o tratamento efectuado, sendo no 7º dia após tratamento com Fansidar® e com Fansidar® + amodiaquina, e no 15º dia após tratamento com Fansidar® + artesunato.

### **II.3.2 - Detecção e identificação parasitária por Microscopia óptica**

Para a identificação dos plasmódios foi efectuada a coloração das lâminas microscópicas, preparadas como descrito em II.2.2.1, colocando-as num suporte com o lado da gota e esfregaço voltado para cima. Seguiu-se a aplicação da solução de Giemsa (diluída a 15%) deixando-se as lâminas a corar por um período entre 20 a 30 minutos. Após esse período procedeu-se a lavagem das lâminas com água corrente e a secagem à temperatura ambiente. Para a coloração do esfregaço este foi fixado previamente com solução de álcool metílico durante um minuto. As lâminas coradas foram observadas pelo técnico de laboratório e pela investigadora do estudo, num microscópio óptico binocular (Zeiss) utilizando uma objectiva de imersão (100X). Por concentrar maior quantidade de sangue, a gota espessa foi analisada para a detecção da infecção e o esfregaço para a identificação da espécie de parasita infectante e determinação da parasitémia. Todas lâminas nas quais se identificou a presença de *P. falciparum*, em D0, foram incluídas no estudo para posterior determinação das parasitémias. Para os pacientes correspondentes procedeu-se a uma nova testagem no dia do controlo.

---

### **II.3.2.1- Determinação das parasitémias.**

A determinação de parasitémias foi realizada através da análise do esfregaço de sangue e em função do número de parasitas por  $\mu\text{l}$  de sangue (W.H.O - Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology., 1991). Esta contagem é baseada no pressuposto de que existem cerca de 8.000 leucócitos num microlitro de sangue humano. Foram observados campos microscópicos correspondentes a 200 leucócitos e registado, em simultâneo, o número de parasitas observados. O número de parasitas foi apresentado sob a forma de “número de eritrócitos parasitados por  $\mu\text{l}$  de sangue” pela fórmula:

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de parasitas} \times 8000 (\text{leucócitos}/\mu\text{l})}{200 \text{ leucócitos}}$$

### **II.3.3 - Detecção e identificação parasitária por PCR**

#### **II.3.3.1- Extracção DNA**

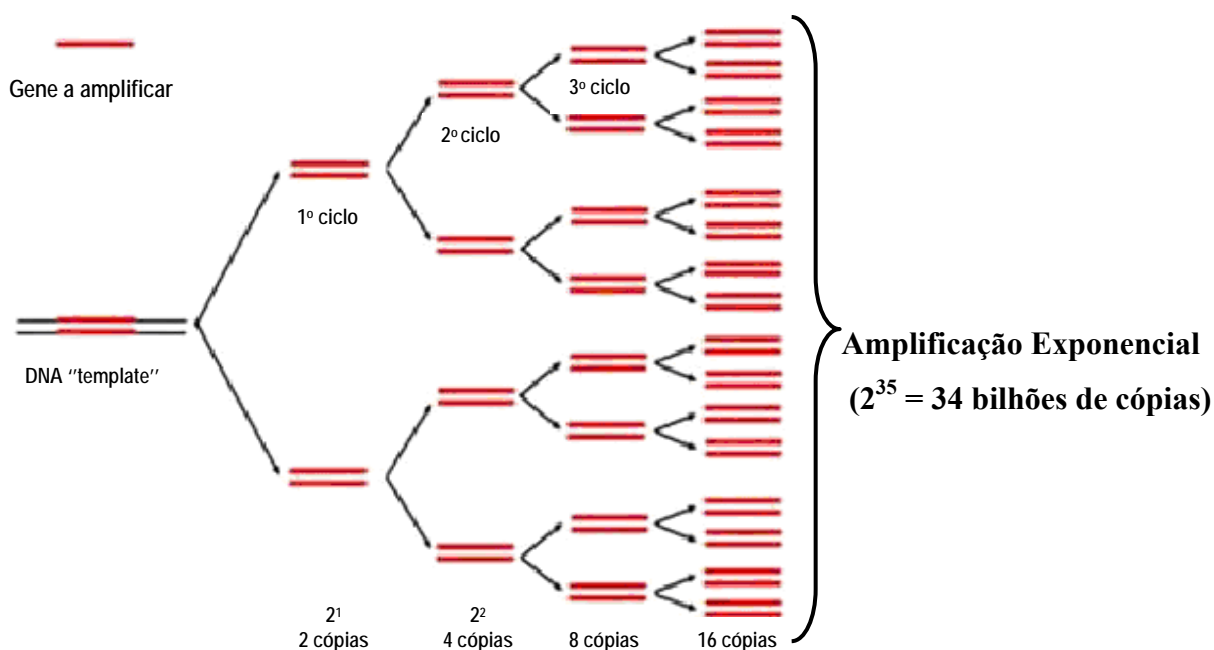
Para extracção de DNA dos isolados de sangue em papel de filtro, previamente acondicionadas como descrito no ponto II.2.2.1, foi utilizado o método de extracção com Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Para tal, foi cortado um fragmento de papel de filtro com uma área de aproximadamente 1  $\text{cm}^2$  correspondendo a cerca 50  $\mu\text{l}$  de eritrócitos parasitados. Para efectuar este procedimento recorreu-se ao auxílio de uma tesoura e pinça, previamente imersas em HCL 5M, seguiu-se a neutralização em NaOH 5M e lavagem em água destilada. O fragmento de papel de filtro foi colocado num tubo de micro-centrifuga de 1,5 ml. A hemólise foi efectuada adicionando-se 1ml de PBS (anexo 1) com 0,5% de Saponina (anexo 1) ao papel de filtro, tendo sido incubadas 4 – 16 h, a 4° C, seguindo-se uma lavagem com PBS (anexo 1) e nova incubação a 4° C, durante 15 - 30 min. A extracção de DNA foi realizada pela adição de 50  $\mu\text{l}$  de uma solução de Chelex a 20% (Biorad), sendo as amostras posteriormente incubadas a 95° C durante 10 min. Finalmente, foram realizadas duas centrifugações (10 000 g/2 min.), a primeira com o objectivo de eliminar o papel de filtro, e a segunda para eliminar os resíduos de Chelex em suspensão na amostra de DNA.

### II.3.3.2 – Amplificação do DNA parasitário por PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

A técnica de PCR consiste na utilização de sequências oligonucleotídicas (*primers*) complementares a sequências alvo específicas no DNA molde, situadas em regiões adjacentes (3' e 5') de cada uma das cadeias da dupla hélice da sequência de DNA a amplificar. As polimerases de DNA apenas podem catalisar reacções de polimerização a partir de uma extremidade 3'-OH livre, as quais são fornecidas pelos *primers*.

A amplificação é baseada numa repetição sequencial de passos: desnaturação, hibridação (*annealing*) e extensão. Em conjunto, estes 3 passos constituem um ciclo de amplificação. Esta técnica permite a síntese de cópias do DNA molde em quantidades acumuláveis de forma exponencial de base 2 ( $2^n$ ; em que  $n$  = número de ciclos de amplificação). A elevada sensibilidade da PCR permite detectar DNA parasitário numa concentração extremamente baixa de até 1 parasita por  $\mu$ l de sangue. Em teoria, apenas uma cópia de DNA molde é suficiente, para produzir por amplificação de milhões de cópias (figura 13).



**Figura 13** - Representação gráfica da amplificação exponencial na técnica de PCR. A taxa de amplificação corresponde a  $2^n$ , onde "n" corresponde ao número de ciclos.

A detecção do DNA parasitário foi feita através da amplificação do gene que codifica para a subunidade menor do ácido ribonucleioco ribossomal (ssrRNA). Estes genes são constituídos por regiões cujas sequências são conservadas entre as diferentes espécies de plasmódios, intercaladas por regiões cujas sequências são específicas para cada uma das espécies (Snounou *et al.*, 1993).



Para a detecção da espécie de plasmódio presente nas amostras foram realizadas duas reacções consecutivas de PCR, sendo na primeira utilizado um par de *primers* específico (rPLU) para o género *Plasmodium* (tabela 7) e na segunda reacção *primers* específicos para as quatro espécies de plasmódios, nomeadamente: *P. falciparum* (rFAL), *P. vivax* (rVIV), *P. ovale* (rOVA) e *P. malariae* (rMAL) (tabela 7). As condições de amplificação, mistura das reacções e sequências dos *primers* encontram-se na tabela 7. A mistura das reacções de amplificação foi constituída por: 1µM de cada *primer*, 10X tampão de PCR (Fermentas), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 1 mM dNTP's (Fermentas) e 120 U/ml de *Taq* DNA polimerase (Fermentas). Para a primeira reacção de PCR utilizou-se 1µl e para o 2º Nested utilizou-se 1,3 µL do produto da primeira reacção de PCR. Apenas os isolados onde se identificou a espécie *P. falciparum*, em D0, foram seleccionados para o estudo. Os pacientes correspondentes foram sujeitos a uma nova análise de identificação da espécie de plasmódio, no dia do controlo (DC).

**Tabela 7** - Condições de amplificação e sequências dos *primers* utilizados nas reacções de PCR para a identificação das espécies de plasmódios

Reacção de PCR	Primers	Condições de amplificação	Tamanho do fragmento amplificado
1 <sup>a</sup>	rPLU5 – 5'-CTTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3' rPLU6 – 5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'	95°C – 5 min 94°C – 1 min x(25) 58°C – 2 min x(25) 72°C – 2 min x(25)	1,2 Kb Género <i>Plasmodium</i>
2 <sup>a</sup>	rFAL1 – 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAA-3' rFAL2 – 5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTA-3'	95°C – 5 min 94°C – 1 min x(35) 58°C – 2 min x(35) 72°C – 2 min x(35)	205pbs <i>P. falciparum</i>
2 <sup>a</sup>	rVIV1 – 5'-CGCTTCTAGCTTATCCACATAAC-3' rVIV2 – 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAG-3'	95°C – 5 min 94°C – 1 min x(35) 58°C – 2 min x(35) 72°C – 2 min x(35)	120pbs <i>P. vivax</i>
2 <sup>a</sup>	rMAL1 – 5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAAT-3' rMAL2 – 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTA-3'	95°C – 5 min 94°C – 1 min x(30) 58°C – 2 min x(30) 72°C – 2 min x(30)	144pbs <i>P. malariae</i>
2 <sup>a</sup>	rOVA1 – 5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTAT-3' rOVA2 – 5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATC-3'	95°C – 5 min 94°C – 1 min x(35) 58°C – 2 min x(35) 72°C – 2 min x(35)	800pbs <i>P. ovale</i>

---

### II.3.3.3 - Electroforese dos produtos amplificados

Os produtos amplificados foram separados em electroforese numa tina horizontal contendo tampão TBE (anexo 2). Para tal foram colocados 12,5µl de produto amplificado em cada poço de gel de agarose a 2% (Gibco,BRL) (anexo 2) juntamente com 5 µl de Ficol/Orange G 5X (anexo 2). Ao mesmo tempo colocou-se um marcador de peso molecular de 100pbs (Fermentas<sup>TM</sup>).

A separação durou cerca de 90 minutos a 4 V/cm. O brometo de etídio (Sigma, Germany) foi incorporado ao gel de agarose, numa concentração final de 0,1 µg/ml, para permitir a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Os géis foram observados e fotografados num transiluminador Eagle Eye II (Stratagene).

### II.3.4 – Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos

#### II.3.4.1 – Composição dos isolados estudados

Os isolados foram obtidos tal como descrito em II.2.2.1. Para permitir uma posterior comparação dos resultados obtidos, foram incluídos no estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos, na análise molecular dos genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1* e *pfATPase6*, todos isolados para os quais foi identificada a presença de *P. falciparum*, por PCR, antes (D0) e depois do tratamento (DC). A análise molecular do gene *pfcrt* foi efectuada apenas nos isolados positivos para *P. falciparum*, antes do tratamento (D0).

Assim, o número de isolados de *P. falciparum* foi agrupado com base no tratamento antimalárico efectuada e consistiu em: i) tratamento com Fansidar® (74 isolados antes e 73 depois do tratamento); tratamento com Fansidar®+Amodiaquina (92 isolados antes e 85 isolados depois do tratamento) e; iii) tratamento com Fansidar®+Artesunato (20 isolados antes e 6 isolados depois do tratamento).

#### II.3.4.2 - Análise dos genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfcrt* e *pfATPase6*

##### II.3.4.2.1 – Reacções de PCR

Após a primeira reacção de amplificação, realizou-se uma segunda na qual se utilizou um determinado volume de DNA amplificado e pares de *primers* específicos para cada uma das posições em estudo.

---

Para o gene *pfATPase6* foi efectuada apenas uma reacção de amplificação. Para o codão 75 do gene *pfcr1* cada amostra foi sujeita a duas amplificações por PCR: uma para detectar o alelo selvagem e a outra para detectar o alelo mutado. Para tal, foram construídos *primers* específicos cujas extremidades 3' continham os tripletos complementares a cada um dos alelos alvo. Estes *primers* permitiram originar um amplicão sempre que o *primer* específico dum determinado alelo emparelhasse com esse alelo, mas não com o alelo alternativo perante condições de PCR similares. Assim sendo, uma amostra com o alelo selvagem (75N) amplifica com o *primer* específico para 75N e não amplifica com o *primer* específico para o alelo mutado (75E) e vice-versa. A presença dos dois alelos (selvagem e mutado) irá gerar amplificações em ambos PCRs. Esta técnica foi primeiramente validada com os clones de *P. falciparum* Hb3 e Dd2 que possuem nessa posição uma asparagina (N) e um ácido glutâmico (E), respectivamente, tendo revelado especificidade óptima, e tendo sido utilizados depois como controlos nas reacções de análise dos isolados.

A mistura das reacções de amplificação foi constituída por: 1µM de cada *primer*, 10X tampão de PCR (anexo 1), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 1 mM dNTP's (anexo 1) e 120 U/ml de *Taq* DNA polimerase (Fermentas), utilizando-se 500 ng de DNA de cada isolado como molde e até 40µl de água bidistilada estéril.

Na tabela 8 encontram-se descritas as condições de PCR para amplificação das regiões dos genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfcr1* e *pfATPase6* bem como os *primers* utilizados e os tamanhos dos fragmentos obtidos.

**Tabela 8** - Sequências dos *primers* e condições de PCR, para a amplificação dos fragmentos dos genes *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfcrtr*, *pfmdr1* e *pfATPase6*

Gene/ Código	PCR	Primers	Condições de PCR/Ciclos
<i>pfdhfr</i>	51	<b>DHFREX F (P1)</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGC-3' <b>DHFREX R (P2)</b> 5'-AGTATATACATCGCTAACAGA-3' 648 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 30''; 50°C, 30''; 72°C, 1'(45 ciclos); 72°C, 3'(1 ciclo)
		<b>DHFR 51F</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT-3' <b>DHFR 51R</b> 5'-GATTCATTACATATGTTGTAAGTGCAC-3' 206 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 1'; 55°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
	59	<b>DHFREX F (P1)</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGC-3' <b>DHFREX R (P2)</b> 5'-AGTATATACATCGCTAACAGA-3' 648 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 30''; 50°C, 30''; 72°C, 1'(45 ciclos); 72°C, 3'(1 ciclo)
		<b>DHFR 59F</b> 5'-GAAATGTAATTCCTAGATATGGAATATT-3' <b>DHFR 59R</b> 5'-TTAATTTCCCAAGTAAACTATTAGATCTTC-3' 326 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 1'; 55°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
	108	<b>DHFREX F (P1)</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGC-3' <b>DHFREX R (P2)</b> 5'-AGTATATACATCGCTAACAGA-3' 648 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 30''; 50°C, 30''; 72°C, 1'(45 ciclos); 72°C, 3'(1 ciclo)
		<b>DHFR 108F</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT-3' <b>DHFR 108R</b> 5'-AAATCCTTGATAAACAACGGAACCTTTTA-3' 522 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 1'; 55°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
164	1ª ampl.	<b>DHFREX F (P1)</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGC-3' <b>DHFREX R (P2)</b> 5'-AGTATATACATCGCTAACAGA-3' 648 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 30''; 50°C, 30''; 72°C, 1'(45 ciclos); 72°C, 3'(1 ciclo)
	2ª ampl.	<b>DHFR 164F</b> 5'-TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT-3' <b>DHFR 164R</b> 5'-AAATCCTTGATAAACAACGGAACCTTTTA-3' 522 pbs	92°C, 3' (1 ciclo); 92°C, 1'; 55°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)

<i>pf dhps</i>	437	1 <sup>a</sup> ampl.	<b>DHPS F</b> 5'-AACCTAAACGTGCTGTTCAA -3' <b>DHPS R</b> 5'-AATTGTGTGATTTGTCCACAA -3' 708pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 1'; 45°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3'(1 ciclo)
		2 <sup>a</sup> ampl.	<b>DHPS 1F</b> 5'-TGCTAGTGTTATAGATATAGGATGAGCATC-3' <b>DHPS 1R</b> 5'-CTATAACGAGGTATTGCATTTAATGCAAGAA-3' 438 pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 1'; 45°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
	540	1 <sup>a</sup> ampl.	<b>DHPS F</b> 5'-AACCTAAACGTGCTGTTCAA -3' <b>DHPS R</b> 5'-AATTGTGTGATTTGTCCACAA -3' 708pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 1'; 45°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3'(1 ciclo)
		2 <sup>a</sup> ampl.	<b>DHPS 1F</b> 5'-TGCTAGTGTTATAGATATAGGATGAGCATC-3' <b>DHPS 1R</b> 5'-CTATAACGAGGTATTGCATTTAATGCAAGAA-3' 438 bp	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 1'; 45°C, 1'; 72°C, 1'(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
<i>pfert</i>	76	1 <sup>a</sup> ampl.	<b>PFCRT 7601F</b> 5'-CCTTGTCGACCTTAACAGATG-3' <b>PFCRT 76N1R</b> 5'-GACTGAACAGGCATCTAACATG-3' 528pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 55°C, 45''; 72°C, 45''(40 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
		2 <sup>a</sup> ampl.	<b>PFCRT 76N2F</b> 5'-GATGGCTCACGTTTAGGTGG-3' <b>PFCRT 76N2R</b> 5'-CTTTTGAATTTCCCTTTTTATTTC-3' 271pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 53°C, 45''; 72°C, 45''(35 ciclos); 72°C, 3' (1 ciclo)
	75	1 <sup>a</sup> ampl.	<b>PFCRT 76N2F</b> 5'-GATGGCTCACGTTTAGGTGG-3' <b>PFCRT 75E-R</b> 5'-TAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTGTTTC-3' 163pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 54°C, 45''; 72°C, 30''(45 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)
		1 <sup>a</sup> ampl.	<b>PFCRT 76N2F</b> 5'-GATGGCTCACGTTTAGGTGG-3' <b>PFCRT 75N-R</b> 5'-TAAAGTTCTTTTAGCAAAAATTGTATT-3' 163pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 54°C, 45''; 72°C, 30''(45 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)

<i>pfmdr1</i>	86	1º ampl.	<b>PFMDR 86OF</b> 5'-ATGGGTAAAGAGCAGAAAGAG-3' <b>PFMDR 86R</b> 5'-CGTACCAATTCCTGAACTCAC-3' 504pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 52°C, 45''; 72°C, 1' (45 ciclos)
		2º ampl.	<b>PFMDR 86NF</b> 5'-GTATGTGCTGTATTATCAGGAGGA-3' <b>PFMDR 86R</b> 5'-CGTACCAATTCCTGAACTCAC-3' 321pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 1'; 51°C, 30''; 72°C, 30'' (25 ciclos)
	1246	1º ampl.	<b>PFMDR 1246F</b> 5'-CTACAGCAATCGTTGGAGAAA-3' <b>PFMDR 1246R</b> 5'-GCTCTAGCTATAGCTATTCTC-3' 504pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 55°C, 30''; 72°C, 45'' (35 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)
		2º ampl.	<b>PFMDR 1246NF</b> 5'-GGAGAAACAGGTAGTGGAAAATC-3' <b>PFMDR 1246NR</b> 5'-CTGTTTTTGTCCACCTGATAAGC-3' 474pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 45''; 55°C, 30''; 72°C, 45'' (35 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)
<i>pfATPase6</i>	110	1º ampl.	<b>PFATP6 110F</b> 5'-CGTTGAACTTATTATATCTTTGTC-3' <b>PFATP6 110R</b> 5'-TTTCATATCTAATAAAGTTAACACG-3' 331 pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 30''; 51°C, 30''; 72°C, 30'' (40 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)
	769S	1º ampl.	<b>PFATP6 769SF</b> 5'-ACTTAGCTTTGCTTATAAAAACTTAA-3' <b>PFATP6 769SR</b> 5'-AATTATCCTTTTCATCATCTCC-3' 272 pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 30''; 51°C, 30''; 72°C, 30'' (40 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)
	1916	1º ampl.	<b>PFATP6 1916F</b> 5'-TATAGGAGAAAATACATTTGATCATG-3' <b>PFATP6 1916R</b> 5'-ACATTCATTTCTCCAAGAAGAA-3' 166 pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 30''; 51°C, 30''; 72°C, 30'' (40 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)
	2694 *	1º ampl.	<b>PFATP6 2694F</b> 5'-GAATTGTTTTCTGTAGAACTGAAC-3' <b>PFATP6 2694R</b> 5'-ATCTGATGCTTCTTTAGCTACC-3' 182 pbs	94°C, 3' (1 ciclo); 94°C, 30''; 51°C, 30''; 72°C, 30'' (40 ciclos); 72°C, 10' (1 ciclo)

\* Referente a um nucleótido não ao número dum aminoácido.

---

#### **II.3.4.2.2 - Electroforese dos produtos amplificados**

Ao DNA amplificado de cada amostra adicionou-se 1/10 do volume final de tampão de aplicação (anexo 2), tendo sido aplicados em cada “poço” do gel de agarose (Gibco, BRL). Todos os geis efectuados apresentavam uma concentração de 2% (anexo 2). A electroforese realizou-se em tampão TBE (anexo 2) a 4 V/cm. O brometo de etídio (Sigma) foi incorporado no gel de agarose, numa concentração final de 0,1 µg/ml, para permitir a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Os géis foram observados e fotografados num transiluminador Eagle Eye II (Stratagene).

#### **II.3.4.2.3 - Identificação dos polimorfismos por PCR-RFLP**

Os polimorfismos dos genes, contidos em cada um dos fragmentos amplificados por PCR, foram identificados pela digestão dos mesmos com enzimas de restrição que reconhecem especificamente os palindromas originados ou eliminados por determinado polimorfismo. Todas as digestões enzimáticas foram realizadas de acordo com os protocolos dos fornecedores dos reagentes. Para a detecção dos polimorfismo no gene *pfcrt* 75 não foram utilizadas enzimas de restrição uma vez que o alelo selvagem e o mutado são distinguíveis apenas por PCR (ver ponto II.3.4.2.1).

A mistura da reacção para a digestão dos fragmentos contendo os codões de estudo consistiu na adição de 0,1 U de enzima, 0,1µg/µl de BSA, 10µl de DNA, tampão 1X e 7,3 µl de água bidistilada estéril. A incubação da mistura de reacção foi efectuada durante 16 horas, dependendo da eficiência de corte de cada enzima, tendo a inactivação da reacção sido realizada por acção da temperatura.

As enzimas e condições de restrição, para identificação dos polimorfismos encontram-se na tabela 9.

**Tabela 9** – Enzimas e condições de restrição para identificação dos polimorfismos

Gene	Codão	“Nested-PCR”	Perfis de Restrição	Temperatura
<i>pfdbhfr</i>	51	206 pb	<i>TasI</i> : 153 pbs + 53 pbs (selvagem -Asn) <i>TasI</i> : 206 pbs (mutado - Ile)	65°C
	59	326 pb	<i>PdmI</i> : 189 pbs + 137 pbs (selvagem - Cys) <i>PdmI</i> : 163 pbs + 137 pbs +27 pb (mutado - Arg)	37°C
	108	522 pb	<i>AluI</i> : 326 pbs + 196 pbs (selvagem - Ser) <i>BseNI</i> : 331 pbs + 191 pbs (mutado - Asn)	37°C 65°C
	164	522 pb	<i>DraI</i> : 245 pbs + 171 pbs + 106 pbs (selvagem - Leu) <i>DraI</i> : 522 pbs (mutado – Ile)	37°C
<i>pfdhps</i>	437	438 pb	<i>HpyF10VI</i> :387pbs + 32 pbs + 19 pbs (selvagem - Ala) <i>HpyF10VI</i> : 419pbs + 19pbs (mutado - Gly)	37 °C
	540	438 pb	<i>BseGI</i> : 438pbs (selvagem - Lys) <i>BseGI</i> : 354pbs + 84pbs (mutado - Glu)	55°C
<i>pfprt</i>	76	271 pb	<i>ApoI</i> : 137pbs+ 124pbs + 10pbs (selvagem - Lys) <i>ApoI</i> : 261pbs + 10pbs (mutado - Thr)	50°C
<i>pfndr1</i>	86	321 pb	<i>ApoI</i> : 249pbs+72pbs (selvagem - Asn) <i>ApoI</i> : 321pbs (mutado -Tyr)	50°C
	1246	474 bp	<i>Eco32I</i> : 256 pbs + 218 pbs (mutado -Tyr) <i>Eco32I</i> : 474 pbs (selvagem - Asp)	37°C
<i>pfATPase6</i>	110	331	<i>MbOII</i> : 103bp + 96pbs+ 92bp + 40pbs (selvagem -R) <i>MbOII</i> : 143 pbs + 96pbs + 92pbs (mutado - K)	37°C
	769S	272	<i>BsPTI</i> : 250pbs + 22pbs (selvagem - S) <i>BsPTI</i> : 272pbs (mutado - N)	37°C
	1916	166	<i>PagI</i> : 166 pbs (selvagem - G) <i>PagI</i> : 144pbs + 22pbs (mutado - D)	37°C
	2694*	182	<i>TasI</i> : 181 pbs + 1 pbs (selvagem - A) <i>TasI</i> : 142 pbs + 39 pbs + 1bp (mutado - T)	65°C

\* Referente a um nucleótido não ao número dum aminoácido.



---

#### II.3.4.2.4 - Electroforese dos produtos da digestão

Aos produtos da digestão enzimática de cada amostra de DNA adicionou-se 1/10 do volume final de tampão de aplicação (anexo 2), tendo sido aplicados em cada “poço” do gel de agarose (Gibco, BRL). Todos os géis efectuados apresentavam uma concentração de 2% (anexo 2). A electroforese realizou-se em tampão TBE (anexo 2) a 4 V/cm. O brometo de etídio (Sigma, Germany) foi incorporado ao gel de agarose, numa concentração final de 0,1 µg/ml, para permitir a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Os géis foram observados e fotografados num transiluminador Eagle Eye II (Stratagene).

#### II.3.4.2.5 - *Primers*

Os *primers* devem ter algumas características relacionadas com a especificidade, que posteriormente se traduzem numa maior eficiência e maior rendimento da reacção de PCR. De seguida são apresentadas algumas considerações gerais a ter em atenção no desenho de *primers*:

- Tamanhos da sequência do *primer* - oligonucleotidos com aproximadamente 18 a 24 pbs constituem *primers* bastante específicos;
- Temperatura de dissociação do par *primer*/sequência alvo – esta temperatura constitui um factor muito importante na especificidade da reacção de PCR;
- Complementaridade da sequência – a formação de dímeros ou homodímeros estáveis entre os *primers*, bem como a existência de auto complementaridade, podem diminuir o rendimento e a especificidade da reacção de PCR;
- Conteúdo Guanina/ Citosina (G/C) – teoricamente a composição de um *primer* deve apresentar um conteúdo de GC entre 45 e 50%, no entanto, em *Plasmodium* é muito difícil conseguir esta percentagem. A inclusão de um ou dois resíduos G ou C na extremidade 3', reduz a possibilidade de hibridações inespecíficas, uma vez que as ligações estabelecidas entre resíduos G/C são mais fortes do que entre A/T.

Todos os *primers* utilizados neste estudo foram adquiridos (MWG-Biotech AG).

---

#### **II.3.4.3 - Análise estatística**

Considerando o número de variáveis, o tipo de resposta pretendida e a dimensão da amostra, os testes estatísticos seleccionados foram os de *Fisher* e *Chi-Square*. Teve-se como objectivo avaliar a existência de uma associação entre as frequências alélicas dos genes *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfmdr1* antes e depois do tratamento, com os diferentes antimaláricos utilizados durante o estudo, quer isoladamente por amostra, quer numa avaliação global com todas as amostras. Os dados foram agrupados numa tabela de contingência e o teste foi realizado com o apoio informático do programa “SISA – Simple Interactive Statistical Analyses” do site [www.http://home.clara.net/sisal/](http://home.clara.net/sisal/), com um intervalo de confiança de 95%, de onde resultam associações estatisticamente significativas quando o valor é de  $P \leq 0,05$ .

#### **II.3.5 - Estudo dos marcadores moleculares do hospedeiro relacionados com susceptibilidade/resistência à malária**

##### **II.3.5.1 - Composição dos isolados de sangue e amostras de mucosa oral estudados**

Os isolados de sangue utilizados corresponderam aos descritos em II.2.2.1. Para o grupo controlo (sem malária) foram utilizadas amostras de mucosa oral obtidas como descrito em II.2.3.1. Assim, foram analisados três grupos diferentes, nomeadamente: i) isolados de sangue de pacientes com malária não complicada; ii) isolados de sangue de pacientes com malária grave e/ou complicada e; iii) amostras de mucosa oral de indivíduos saudáveis.

##### **II.3.5.2 - Extracção DNA dos isolados de sangue**

Para extracção de DNA dos isolados de sangue em papel de filtro, *Whatman* nº 4, foi utilizado o método de extracção de Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tal como descrito em II.3.3.1.

##### **II.3.5.3 – Extracção de DNA de amostras de mucosa oral**

Para a extração de DNA das amostras de mucosa oral foi utilizada a técnica de *salting out* onde os isolados foram centrifugados a 14.000 rpm, descartado o sobrenadante, seguindo-se a ressuspensão em 200 µl da solução High TE (anexo 1) sendo esta solução sujeita a vórtex e

adicionada 270 µl da solução de Madisen Lysis (anexo 1) e 10 µl de proteinase K (anexo 1). Esta solução foi sujeita a vórtex e incubada a 37 °C durante a noite.

Seguiu-se a adição de 120 µl de NaCl 6M (anexo 1), vórtex e centrifugação durante 20 minutos a 14.000 rpm. Retirou-se o sobrenadante sendo este transferido para um novo tubo onde foi adicionado 600 µl de etanol gelado a 100%. Deixou-se durante 30 a 60 minutos a -20 °C. A solução foi centrifugada durante 20 minutos a 14.000 rpm e desprezado o sobrenadante. Seguiu-se a secagem a 60 °C, durante 1 hora e ressuspensão do pellet em 40 µl de água.

#### III.3.5.4 - Detecção da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> no gene *ICAM-1*

A mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> foi detectada através da técnica de PCR-RFLP. Esta reacção consistiu na num ciclo de desnaturação inicial a 94°C (5 min), seguida de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C (30 seg), hibridização a 56°C (30 seg) e extensão a 72°C (30 seg), terminando com extensão final a 72°C (20 min).

A mistura de reacção, de 50 µl, foi feita seguindo as seguintes condições: 0,5µM de cada primer, 200 µM de dNTP (anexo 1), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão 10X (anexo 1) e 0.5 U de *Taq* polimerase, por tubo. Os produtos de amplificação correram em gel de agarose a 2%. Em seguida, procedeu-se à digestão dos fragmentos amplificados com a enzima de restrição *Nla* III (New England Biolabs, Beverly, MA). A digestão ocorreu a 37°C numa solução tampão de 50 mM KCl, 20 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM acetato de magnésio e 1 mM de dithiothreitol. Os produtos de digestão correram numa electroforese num gel de agarose a 2%. A sequência dos *primers* e as condições da restrição encontram-se na tabela 10.

**Tabela 10** - Sequência dos *primers* e condições da restrição utilizadas na análise da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup>

Polimorfismo	Técnica (enzima)	<i>Primers</i>	Temperatura
K29/M29	PCR-RFLP ( <i>Nla</i> III)	(D)TCCGGGCTCAGTTACTCACAGTACACG (R) TCTTCCCTCGTTTCTTCTAGGACCGG	37°C

### II.3.5.5 - Detecção da mutação T1264G no gene *CD36*

A mutação T1264G foi detectada através da técnica de PCR-RFLP e consistiu na amplificação por PCR da região do gene a analisar, seguida de digestão dos produtos de amplificação e separação electroforética dos produtos digeridos.

Esta reacção compreendeu um passo de desnaturação inicial a 94°C (5 min), seguida de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C (30 seg), hibridização a 55°C (30 seg) e extensão a 72°C (45 seg), terminando com extensão final a 72°C (10 min). A mistura de reacção foi feita para um volume de 12,5 µl, contendo 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo de iniciação, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM de KCl, 0,08% Nonidet, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U de *Taq* polimerase, por tubo.

Em seguida, procedeu-se à digestão dos fragmentos amplificados com a enzima de restrição *NdeI*. Para tal, 2,5 µl de produto de amplificação foram adicionados a 0,5 µl de enzima (5 U) e 0,5 µl de tampão da enzima, para um volume final de 5 µl por tubo. A digestão decorreu durante duas horas, a 50°C. A separação dos fragmentos de digestão foi realizada por electroforese em gel de poliacrilamida 10% (anexo 2), sobre uma placa horizontal de arrefecimento a 9°C, tendo-se utilizado para o efeito uma solução tampão (anexo 2). A sequência dos *primers* e as condições da restrição encontram-se na tabela 11.

**Tabela 11** - Sequência dos *primers* e condições da restrição utilizadas na análise da mutação T1264G.

Polimorfismo	Técnica (enzima)	<i>Primers</i>	Temperatura
T1264G	PCR-RFLP ( <i>NdeI</i> )	(D)CTATGCTGTATTTGAATCCGACGTT (R)ATGGACTGTGCTACTGAGGTTATTTACTC	50°C

A visualização dos fragmentos de DNA foi obtida através da coloração do gel com nitrato de prata (anexo 2). Para tal o gel foi colocado numa solução de etanol 10% durante 5 minutos, seguiu-se a oxidação do gel numa solução de ácido nítrico 1% durante 3 minutos tendo-se procedido à lavagem do gel em água destilada. Em seguida, o gel foi colocado numa solução de nitrato de prata 0.012 M durante 20 minutos, seguindo-se a lavagem do gel em água destilada e a colocação numa solução de carbonato de sódio 0.28 M e formalina 0.019% até que a solução apresentasse a cor

---

castanha. Em seguida colocou-se o gel em ácido acético glacial durante 2 minutos, lavou-se com água destilada durante dois minutos e deixou-se a secar a temperatura ambiente.

#### **II.3.5.6 – Análise estatística**

Os dados foram agrupados numa tabela de contingência e o teste realizado foi o *Chi-Square* com o apoio informático do programa “SISA – Simple Interactive Statistical Analyses” do site [www.http://home.clara.net/sisa/](http://home.clara.net/sisa/), com um intervalo de confiança de 95%, de onde resultam associações estatisticamente significativas quando o valor é de  $P \leq 0,05$ .

### **II.3.6 - Estudo dos factores genéticos humanos associados ao metabolismo de fármacos antimaláricos**

#### **II.3.6.1 -Composição dos isolados estudados**

Para esta análise foram utilizados isolados de sangue colhidos e processados tal como descrito em II.2.2.1.

#### **II.3.6.2 - Extracção de DNA**

Para extracção de DNA das amostras de sangue em papel de filtro, *Whatman* nº 4, foi utilizado o método de extracção de Chelex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), tal como descrito em II.3.3.1.

#### **II.3.6.3 - Identificação dos polimorfismos no gene *CYP2C8***

A detecção dos polimorfismos no gene *CYP2C8* foi efectuada através da análise dos SNPs utilizando a técnica de PCR-RFLP. Esta reacção compreendeu um passo de desnaturação inicial a 94°C (3 min), seguida de 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C (30 seg), hibridização a 55°C (30 seg) e extensão a 72°C (30 seg), terminando com extensão final a 72°C (5 min).

A mistura de reacção foi feita para um volume de 25 µl, contendo 1X de tampão de PCR (anexo 1), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cada *primer*, 250 µM de dNTPs e 1 U de *Taq* polimerase, por tubo. Em seguida, procedeu-se à digestão dos fragmentos amplificados e a corrida dos mesmos

numa electroforese num gel de agarose a 2%. A sequência dos *primers* e as condições da restrição encontram-se na tabela 12.

**Tabela 12** - Sequência dos *primers* e condições da restrição utilizadas na análise dos polimorfismos no gene *CYP2C8*.

Polimorfismo	Técnica (enzima)	<i>Primers</i>	Temperatura
A1196G	PCR-RFLP ( <i>Bcl</i> II )	(D) CTTCCGTGCTACATGATGACG (R) CTGCTG AGAAAGGCATGAAG	55°C
C792G	PCR-RFLP ( <i>Taq</i> I )	(D)ATGTTGCTC TTACACGAAGTTACA (R)ATCTTACCTGCTCCATTTTGA	48 °C
A805T	PCR-RFLP ( <i>Bcl</i> II )	(D)ATGTTGCTC TTACACGAAGTTACA (R)ATCTTACCTGCTCCATTTTGA	48 °C

---

### **CAPÍTULO III**

---

### III - RESULTADOS

Este estudo teve por objectivo efectuar uma investigação associada à malária em crianças, sob o ponto de vista parasitológico e de genética humana. Os resultados obtidos, a seguir descritos, dão uma informação geral para aplicação dos mesmos na área da resistência aos antimaláricos, em Moçambique.

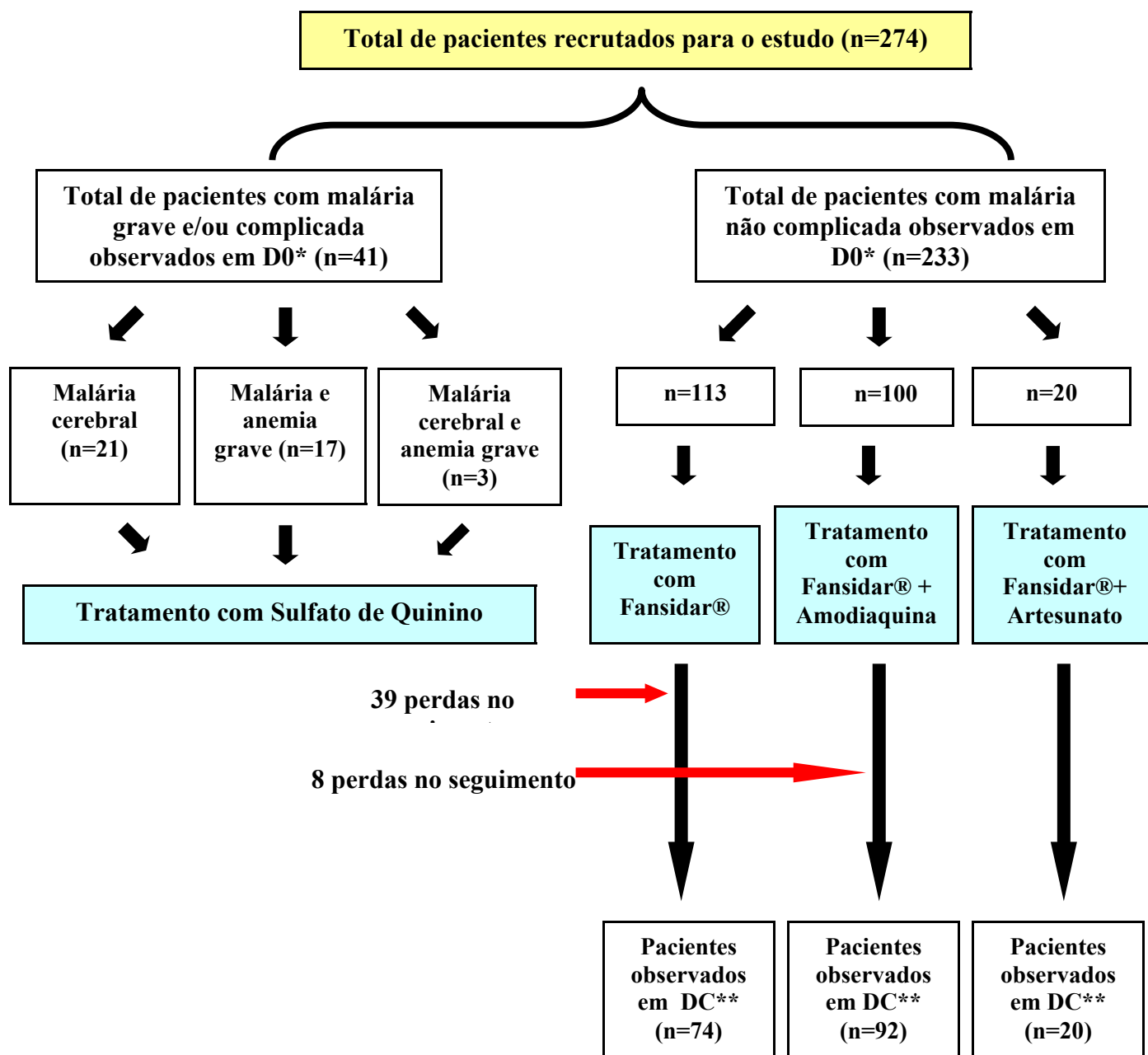
A colheita dos isolados de sangue foi efectuada em três unidades sanitárias (US) da província de Maputo, Moçambique, tendo sido envolvidos um total de 274 pacientes dos quais 233 (85%) com malária não complicada e 41 (15%) com malária grave e/ou complicada (cerebral e/ou com anemia grave) (figura 14).

Para os pacientes com malária não complicada foram colhidos isolados de sangue antes do tratamento, no dia de admissão hospitalar [designado dia zero (D0)], e depois do tratamento [designado dia do controlo (DC)]. Todos pacientes deste grupo estavam em regime ambulatorio e, após o diagnóstico e tratamento recebiam alta com recomendação, por parte do profissional de saúde da US, para regressarem ao controlo para verificação da cura clínica e parasitológica. O dia do controlo variou dependendo do tratamento efectuado, sendo no 7º dia após tratamento com Fansidar® e com Fansidar® + amodiaquina, e no 15º dia após tratamento com Fansidar® + artesunato. Contudo, por várias razões (ex: falta de disponibilidade, longa distância até a US, falta de transporte) nem todos pacientes regressaram exactamente nas datas indicadas pelo profissional de saúde. Os pacientes eram também orientados para que, no caso de agravamento do quadro clínico, regressassem o mais rápido possível à US, mesmo antes da data prevista para o controlo. Dos 233 pacientes com malária não complicada, observados em D0, 186 retornaram ao controlo o que demonstrou uma perda de 20% (figura 14).

Para os pacientes com malária grave e/ou complicada, devido a vários constrangimentos principalmente relacionados com as condições hospitalares pouco favoráveis para a investigação, não foi realizado o seguimento destes tendo sido colhidos isolados de sangue apenas no dia da admissão hospitalar (D0). Após observação, na admissão hospitalar, todos pacientes com malária grave e/ou complicada foram internados na Unidade de Cuidados Intensivos do Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo. Sendo assim, observaram-se 41 pacientes com malária grave e/ou complicada com a seguinte distribuição, segundo o quadro clínico apresentado: 21 com malária cerebral, 17 com malária e anemia grave e 3 com malária cerebral e anemia grave (figura 14).



**Figura 14** - Evolução do número de pacientes incluídos no estudo



**D0\***- antes do tratamento

**DC\*\*** - após o tratamento

Todos pacientes envolvidos no estudo foram, após observação clínica, tratados pelo profissional de saúde da US com antimaláricos em dosagens calculadas segundo o peso corporal, de acordo com o esquema terapêutico vigente (figura 15).

**Figura 15** - Antimaláricos prescritos e respectivas doses

- Fansidar® (S/P): sulfadoxina (25 mg/kg)/pirimetamina (1.25 mg/kg), via oral, dose única;
- Amodiaquina: 10 mg/kg/dia, via oral, durante 3 dias;
- Artesunato: 4 mg/kg/dia, via oral, durante 3 dias;
- Sulfato de Quinino (dose de impregnação): 20 mg/Kg, uma dose pela via endovenosa, seguida da dose de manutenção de 10mg/Kg, de 8/8 horas, via endovenosa, durante 7 dias.

Para os pacientes com malária não complicada, caso não fosse possível realizar a primeira ou a segunda linha de tratamento pela via oral (ex: no caso de vômitos), era prescrito o sulfato de quinino pela via intramuscular, a cada 8 horas, durante três dias, sendo posteriormente adicionada a primeira ou a segunda linha de tratamento da malária (tabela 13). Os pacientes com malária grave e/ou complicada foram tratados com sulfato de quinino durante sete dias (figura 15), sendo depois adicionada a primeira ou segunda linha de tratamento da malária (tabela 13).

**Tabela 13** - Linhas de tratamento antimalárico, instituídas nos últimos 5 anos, em Moçambique (*Programa Nacional de Controlo da Malária – PNCM, Ministério da Saúde de Moçambique*)

Linhas de tratamento	Período (anos)		
	Antes de 2002	2002 – 2004 (1º semestre)	A partir de 2004 (Junho)
1ª Linha	Cloroquina	Fansidar® (sulfadoxina/pirimetamina) +Amodiaquina	Fansidar® (sulfadoxina/pirimetamina) +Artesunato
2ª Linha	Fansidar®	Coartem <sup>TM</sup> (lumefantrina + artemeter)	Coartem <sup>TM</sup> (lumefantrina + artemeter)
3ª Linha	Quinino	Quinino	Quinino

O número de isolados analisados, antes e depois do tratamento, segundo a forma clínica de malária e o tratamento efectuado, está exemplificado na tabela 14.

**Tabela 14** – Número de isolados analisados no estudo

FORMA CLÍNICA DE MALÁRIA	TRATAMENTO EFECTUADO	NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS	
		Antes do tratamento (D0)	Depois do tratamento (CONTROLO-DC)
Malária grave e/ou complicada	Quinino	41	N/A
Malária Não complicada	Fansidar®	74	74
	Fansidar® + Amodiaquina	92	92
	Fansidar® + Artesunato	20	20

Fansidar®: sulfadoxina/pirimetamina; N/A: não aplicável

A investigadora do estudo não teve um papel activo na solicitação dos exames laboratoriais nem na selecção do tipo de terapêutica instituída aos pacientes. Tanto um como o outro foram efectuados pelo profissional de saúde da US, sendo a solicitação de exames laboratoriais feita em função do quadro clínico de cada paciente e o tratamento segundo orientações do Programa Nacional de Controlo da Malária (tabela 13). De referir que, em Moçambique, a primeira e a segunda linha de tratamento da malária são indicadas para a malária não complicada estando a terceira linha reservada para as formas de malária grave e/ou complicada (tabela 13).

Para melhor compreensão dos resultados, o presente capítulo será organizado em diferentes sub-capítulos de acordo com as linhas de estudo desenvolvidas. No final de cada sub-capítulo existirá um breve resumo dos pontos que se consideram importantes. Deste modo, os sub-capítulos aqui contidos são os seguintes:

- III.1-** Identificação das espécies de plasmódios e determinação das parasitémias.
- III.2-** Caracterização das formas clínicas de malária nos pacientes do estudo.
- III.3-** Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos.
- III.4-** Estudo de factores genéticos humanos relacionados com a susceptibilidade/resistência à malária.
- III.5-** Estudo de factores genéticos humanos associados a metabolismo de fármacos antimaláricos.

---

### **III.1 - Identificação das espécies de plasmódios e determinação das parasitémias**

Para os pacientes malária grave e/ou complicada, devido a ausência de amostras no dia controlo (DC), a análise foi efectuada apenas para os isolados de sangue presentes no dia de admissão hospitalar (D0). Para os pacientes com malária não complicada, a análise foi efectuada em todos isolados de sangue presentes antes e depois do tratamento com os diferentes antimaláricos. As técnicas utilizadas para a identificação da espécie de parasita infectante foram a Microscopia óptica e o PCR. Para determinação das parasitémias utilizou-se a técnica de Microscopia óptica.

#### **III.1.1 - Detecção e identificação parasitária por Microscopia óptica**

A detecção e identificação parasitária por microscopia óptica foi feita como descrito em II.3.2. Todos isolados nos quais se identificou a espécie *P. falciparum*, em D0, foram incluídos no estudo e os pacientes correspondentes novamente testados depois do tratamento, no dia do controlo (DC). Em todos isolados de sangue positivos para plasmódio, em DC, a única espécie identificada foi o *P. falciparum*. O resultado desta análise é apresentado na tabela 16.

#### **III.1.2 - Determinação das parasitémias por Microscopia óptica**

A avaliação semiquantitativa da parasitémia (tabela 15), foi realizada pelo técnico de laboratório da unidade sanitária, e expressa pelo sistema de cruces, utilizando a seguinte classificação (W.H.O - Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology., 1991):

- + = um a dez parasitas por cem campos;
- ++ = dez a cem parasitas por cem campos;
- +++ = um a dez parasitas por campo;
- ++++ = onze ou mais parasitas por campo.

**Tabela 15** - Parasitémias, categorizadas em cruces, nos pacientes com malária no dia de admissão hospitalar (D0)

Parasitémias	Malária grave e/ou complicada	Malária não-complicada		
	(n=41) n (%)	(n=113) n (%)	(n=100) n (%)	(n=20) n (%)
+	1 (4,2)	26(23,0)	26 (26,0)	4 (20,0)
++	3 (12,5)	45(39,8)	28 (28,0)	1 (5,0)
+++	5 (20,8)	12(10,6)	21 (21,0)	4 (20,0)
++++	9 (37,5)	18(16,0)	19 (19,0)	11 (55,0)
> ++++	6 (25,0)	12(10,6)	6 (6,0)	0 (0,0)

Todas as lâminas de sangue foram observadas pela investigadora do estudo, para a determinação das parasitémias, utilizando o critério descrito no ponto II.3.2.1. A variação da densidade parasitária (valor máximo e mínimo) de *P. falciparum*, está resumida nas tabelas 17 e 18.

### III.1.3 - Detecção e identificação parasitária por PCR

A detecção e identificação parasitária por PCR foi feita como descrito em II.3.3. Todos isolados nos quais se identificou o DNA da espécie *P. falciparum*, em D0, foram seleccionados e os pacientes correspondentes novamente testados depois do tratamento, no dia do controlo (DC). O resultado desta análise é apresentado na tabela 16.

**Tabela 16** - Prevalências de *P. falciparum*

TIPO DE TRATAMENTO	Microscopia óptica		PCR	
	D0	DC	D0	DC
<b>Quinino</b>	41 (100%)	N/A	41 (100%)	N/A
<b>Fansidar®</b>	74 (100%)	28 (38%)	74 (100%)	73 (98%)
<b>Fansidar®+ Amodiaquina</b>	92 (100%)	2 (2,2%)	92 (100%)	85(92,3%)
<b>Fansidar® + Artesunato</b>	20 (100%)	2 (10%)	20 (100%)	6 (30%)

N/A: não aplicável

---

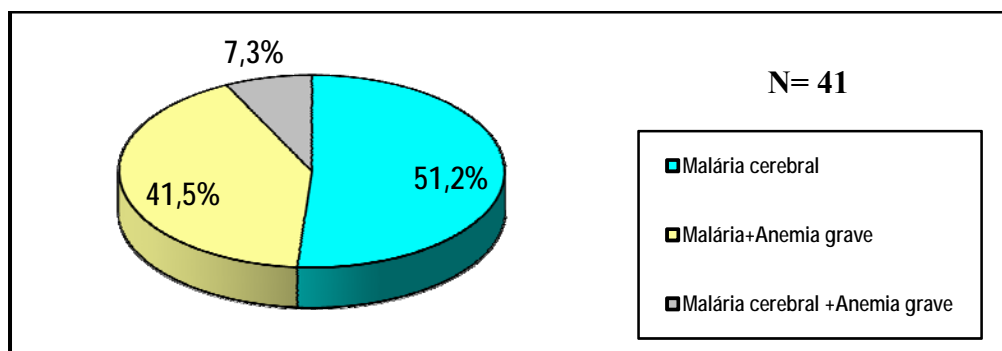
### III.1.4 - Resumo

- O *P. falciparum* foi a única espécie identificada, tanto por M.O como por PCR, em todos isolados de sangue incluídos no estudo.
- A sensibilidade da técnica de PCR, na detecção e identificação do *P. falciparum*, mostrou ser superior quando comparada com a técnica de M.O, principalmente nos isolados de sangue depois do tratamento. Esta situação foi mais evidente no grupo de pacientes tratados com Fansidar®, onde foi identificada a presença de *P. falciparum* em 98% depois do tratamento (tabela 16).
- Ao fazermos uma análise global, verificamos que de um total de 186 isolados de sangue positivos para *P. falciparum* em D0, 32 (17,3%) e 164 (81,2%) apresentavam-se positivos para *P. falciparum* em DC, na análise por M.O e PCR, respectivamente.

## III.2 - Caracterização clínica dos pacientes do estudo

### III.2.1- Pacientes com malária grave e/ou complicada

Do ponto de vista clínico, as formas de malária grave e/ou complicada identificadas neste grupo foram: a malária cerebral com alteração do nível de consciência, incluindo o coma, a malária cerebral associada à anemia grave e a anemia grave. No presente estudo, para as 41 crianças com malária grave e/ou complicada verificou-se a seguinte distribuição dos diferentes quadros clínicos: malária cerebral 21 (51,2%), anemia grave 17 (41,5%) e malária cerebral + anemia grave 3 (7,3%) (figura 16).



**Figura 16** - Distribuição das formas clínicas de malária grave e/ou complicada

A anemia grave foi definida pela concentração de hemoglobina  $<5$  g/dL (ou um hematócrito  $<15\%$ ). Apesar de, nas unidades sanitárias em Moçambique, o doseamento da hemoglobina em pacientes com malária ser uma actividade de rotina, quando este exame não está disponível o diagnóstico da anemia é feito por critérios clínicos como a observação da coloração das mucosas e das palmas das mãos e plantas dos pés. No presente estudo foi possível, para todos casos, determinar laboratorialmente o valor da hemoglobina no dia de admissão hospitalar (D0). A correcção da anemia grave foi feita pela administração de transfusão de sangue (concentrado de glóbulos vermelhos) na dose de 15 ml/kg. Esta medida constitui um dos pilares fundamentais para evitar o agravamento do quadro clínico, principalmente em crianças que estando fisiologicamente adaptadas às concentrações baixas de hemoglobina podem descompensar rapidamente devido a variedade e gravidade das manifestações clínicas da malária. No entanto, devido à pandemia do VIH no País, a opção de transfundir contou, para além do doseamento da hemoglobina, com outros

critérios clínicos de gravidade, avaliados pelo profissional de saúde, como por exemplo a existência de sinais de compromisso cardíaco, a dispnéia grave e a hiperparasitémia.

Em relação à malária cerebral, a sua classificação foi feita com base em critérios da O.M.S (W.H.O., 2000). No entanto, deve ser aqui referido que devido a existência de muitas diferenças na frequência das várias manifestações clínicas, em diferentes idades e em diferentes níveis de endemicidade, a generalização destes critérios é limitada. Em relação ao quadro clínico dos pacientes com malária cerebral, todos apresentaram convulsões generalizadas de repetição no dia da admissão hospitalar, sendo que 11 (45,8%) estavam em coma. Foram ainda registados neste grupo três óbitos nas primeiras 24 horas depois da admissão hospitalar. A causa directa de morte não foi elucidada uma vez que não foi autorizada, por parte dos pais ou acompanhantes dos pacientes, a realização de autópsias. Não tendo sido realizado o seguimento das crianças deste grupo desconhece-se se terá havido mais algum óbito. As características dos pacientes com malária grave e/ou complicada estão representadas na tabela 17.

**Tabela 17 -** Características dos pacientes com malária grave e/ou complicada, em D0, segundo o tratamento efectuado

<b>Característica</b>	<b>Tratamento</b>
	<b>Sulfato de Quinino</b>
Idade (meses/anos)	8 meses à 7 anos
Sexo - feminino	23 (56%)
- masculino	18 (44%)
Hemoglobina (gr/dl)	
- valor mínimo	2,1 gr/dl
- valor máximo	12,6 gr/dl
Densidade parasitária	
- mínima	1,1%
- máxima	5,72%
Uso de antimaláricos até 2 semanas antes do estudo	9 (21,9%)



### III.2.2 - Pacientes com malária não complicada

Nas 233 crianças com malária não complicada, os sintomas variaram, sendo a febre, as manifestações gastro-intestinais (diarreia e/ou vômitos) e as convulsões febris os mais frequentes, com (97,4%), (51,9%) e (22,3%), respectivamente. Outros sintomas considerados menos frequentes foram a diminuição do apetite, cefaleia, tosse e astenia. Uma chamada de atenção esteve relacionada à presença de convulsões neste grupo de pacientes que, pelas suas características, foi classificada como uma complicação da febre não estando associada à malária cerebral (Akpede *et al.*, 1993; Wattanagoon *et al.*, 1994).

O doseamento da hemoglobina foi efectuado em todas as crianças deste grupo no dia da admissão hospitalar (D0), não tendo sido detectados valores iguais ou inferiores a 5g/dl. Dos 186 que se apresentaram no dia do controlo (DC), 98,4% estavam clinicamente bem, mesmo aqueles nos quais foi detectada a presença do *P. falciparum* (tabela 16). Em 3 casos (1,6%), no grupo tratado com sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®), foi necessário o internamento das crianças, no dia do controlo, por estas apresentarem-se com agravamento do estado geral. As características dos pacientes com malária não complicada estão representadas na tabela 18.

**Tabela 18** - Características dos pacientes com malária não complicada, em D0, segundo o tratamento efectuado

Característica	Tratamento		
	Fansidar®	Fansidar®+ Amodiaquina	Fansidar®+ Artesunato
Idade (meses/anos)	5 meses à 15 anos	3 meses à 15 anos	4 meses à 5 anos
Sexo - feminino	54 (47,8%)	54 (54%)	8 (40%)
- masculino	59 (52,2%)	46 (46%)	12 (60%)
Hemoglobina (gr/dl)			
- valor mínimo	5,4gr/dl	6,1gr/dl	5,8gr/dl
- valor máximo	11,5 gr/dl	11,3gr/dl	10,2gr/dl
Densidade parasitária			
- mínima	0,21%	0,5%	0,3%
- máxima	5,7%	5,68%	4,8%
Uso de antimaláricos até 2 semanas antes do estudo	1 (0,8%)	0%	0%

---

### III.2.3 - Resumo

- Do total de 274 pacientes recrutados, 233 (85%) e 41 (5%) tinham malária não complicada e malária grave e/ou complicada, respectivamente.
- Dos 233 pacientes com malária não complicada, 186 (80%) regressaram ao controlo.
- Dos 41 pacientes com malária grave e/ou complicada, 51,2% tinham malária cerebral, 41,5% malária e anemia grave e 7,3% malária cerebral e anemia grave.
- Nos pacientes com malária grave e/ou complicada ocorreram 3 óbitos, durante as primeiras 24 horas depois do internamento, na forma clínica de malária cerebral.
- A sintomatologia predominante nos pacientes com malária não complicada foi a febre (97,4%), as manifestações gastro-intestinais (51,9%) e as convulsões febris (22,3%).
- Três pacientes (1,6%) com malária não complicada tratados com Fansidar®, apresentaram-se no dia do controlo (DC) com agravamento do quadro clínico tendo sido internados na unidade sanitária. Os restantes pacientes deste grupo apresentavam-se clinicamente “curados” no dia do controlo.

---

### III.3 - Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos

A área de trabalho foi seleccionada não só pela possibilidade de execução do trabalho, uma vez que a investigadora deste estudo é Médica Pediatra e trabalha no Departamento de Pediatria do Hospital Central de Maputo, como também pela existência de protocolos de colaboração entre o CMDT LA/ IHMT, a Faculdade de Medicina da UEM e o Hospital Central de Maputo/MISAU. Por outro lado, pesou também o facto de se saber da existência de *P. falciparum* resistente aos antimaláricos na região.

Para ser possível efectuar comparações entre os resultados obtidos antes e depois do tratamento, com os diferentes antimaláricos, foram aqui analisados apenas os isolados de D0 e DC nos quais estivesse presente o *P. falciparum*, identificado por PCR (ver ponto II.3.4.1 ).

#### III.3.1 - Pesquisa de polimorfismos genéticos

Para permitir a comparação dos resultados obtidos na análise dos isolados antes (D0) e depois do tratamento (DC), com os diferentes antimaláricos, a pesquisa dos polimorfismos genéticos para o estudo da resistência aos antimaláricos foi dirigida aos genes *pfdhfr* e *pfdhps* (associados à resistência a pirimetamina e sulfadoxina), *pfmdr1* (associado a resistência a amodiaquina) e *pfATPase6* (associado resistência a artemisinina e seus derivados). O nosso estudo incluiu também a análise dos polimorfismos do gene *pfprt* (associado a resistência à cloroquina), apenas em isolados de D0.

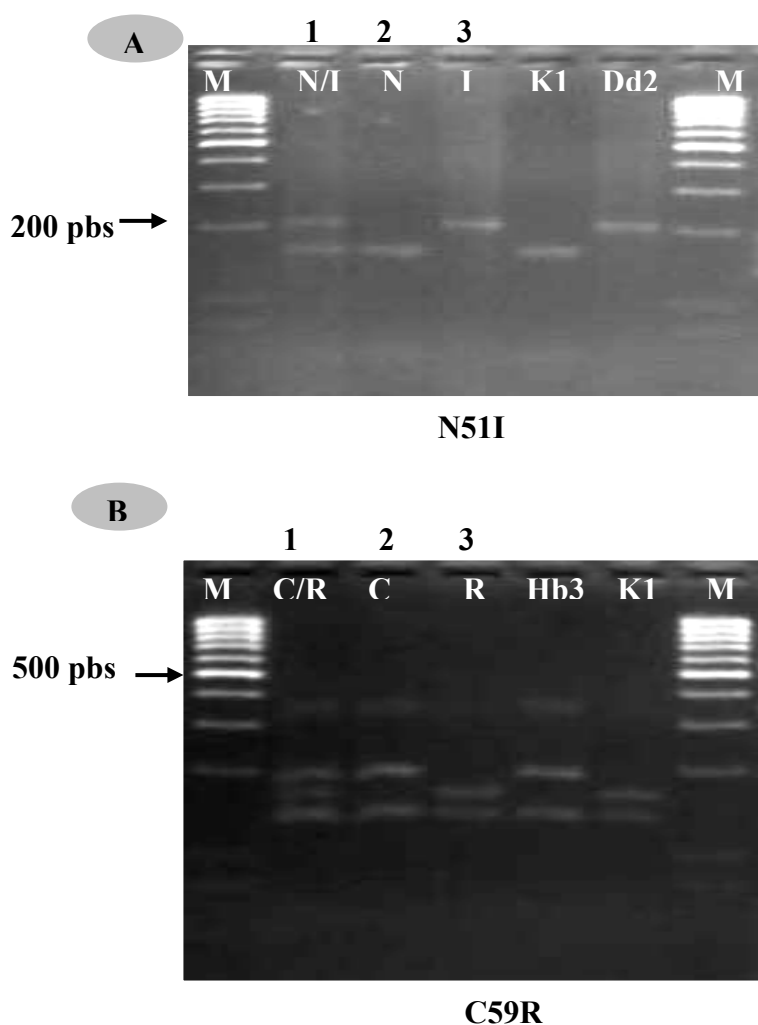
Esta análise foi efectuada recorrendo a técnica de PCR-RFLP utilizando *primers* específicos, tendo-se desenvolvido e optimizado os PCRs para amplificação desses genes. As condições específicas de cada reacção de PCR e os *primers* utilizados são apresentadas na tabela 8. Os polimorfismos contidos em cada um dos fragmentos, amplificados por PCR, foram identificados pela digestão dos mesmos com diferentes enzimas de restrição com capacidade de reconhecer sequências específicas e catalisar a sua clivagem (tabela 9). Todas as digestões foram realizadas segundo os protocolos dos fornecedores.

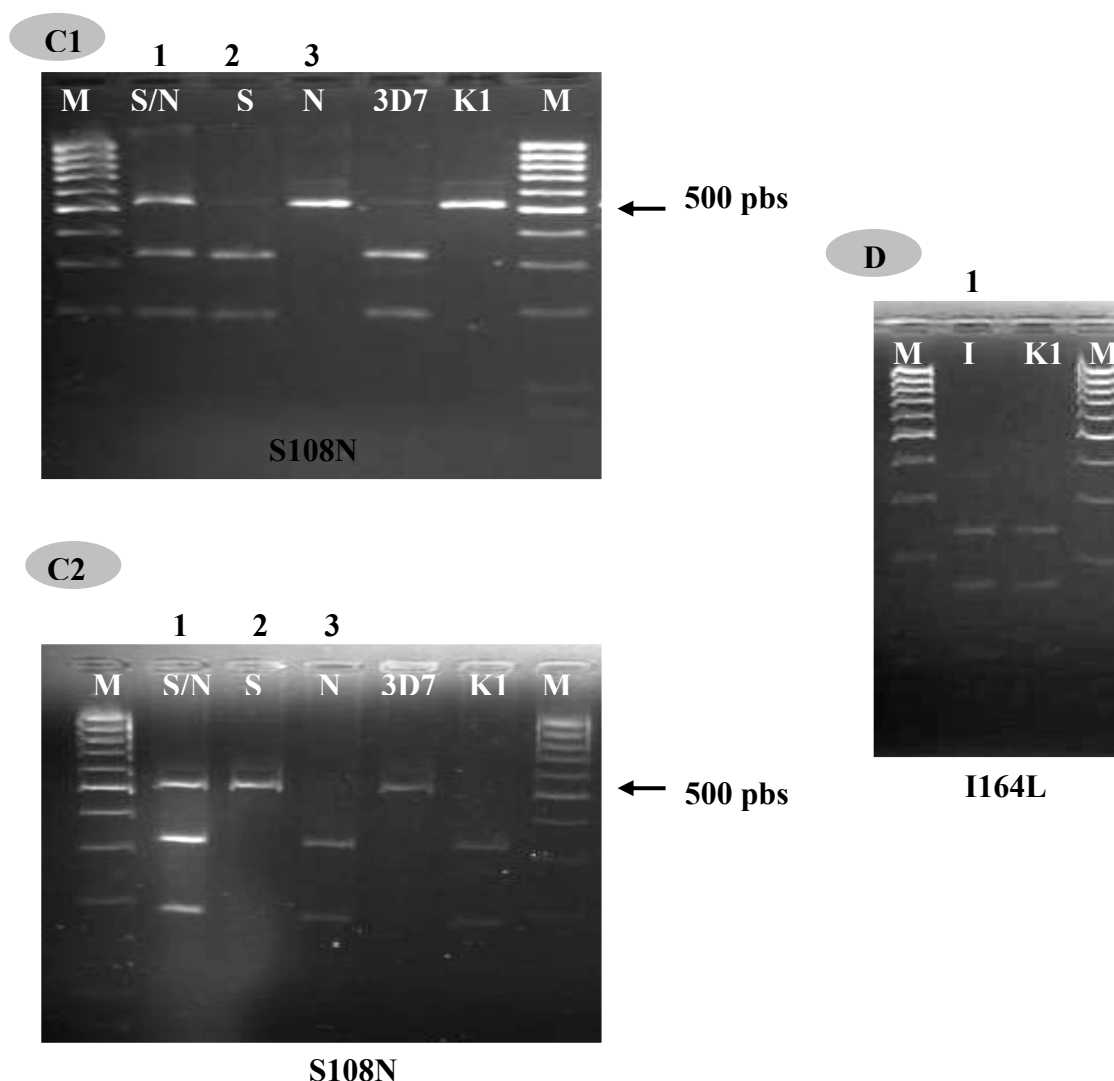
- **Gene *pfdhfr***

Para a detecção do polimorfismo N51I, a enzima *TasI* reconhece o local de corte na presença do alelo selvagem 51N, originando-se dois fragmentos com 153 e 53 pbs. Na presença do alelo mutado 51I não ocorre corte, ficando o mesmo tamanho do fragmento amplificado por PCR (206

pbs) (figura 17). Foi utilizado como controle positivo o clone Dd2 e como controle negativo o clone K1. Para o polimorfismo C59R foi utilizada a enzima *PdmI* que reconhece e corta na presença do alelo selvagem 59C, originando dois fragmentos de 189 e 137 pbs, enquanto que na presença do alelo mutado origina 3 fragmentos de 162, 137 e 27 pbs. Utilizou-se como controle positivo o clone K1 e como controle negativo o clone HB3 (figura 17).

Para detecção do polimorfismo S108N utilizaram-se duas enzimas (*AluI* e *BseNI*). Para as amostras nas quais uma das enzimas não reconhece o local de corte foi utilizada a outra enzima. Quando se utilizou a enzima *AluI*, na presença do alelo selvagem (108S), originaram-se dois fragmentos com 326 e 196 pbs. Para a enzima *BseNI*, na presença do alelo mutado (108N) originam-se dois fragmentos com 331 e 191 pbs. Para as amostras cuja enzima não reconhece o local de corte permanece o fragmento de 522 pbs, correspondente ao produto amplificado por PCR (figura 17). Em relação ao polimorfismo I164L foi identificado o alelo selvagem 164I em todos isolados analisados, na presença do qual a enzima *DraI* originou três fragmentos de 245, 171 e 106 pbs (figura 17).





**Figura 17** - Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para a identificação dos polimorfismos no gene *pfdhfr* 51,59,108 e 164.

**(A)- Identificação do polimorfismo N51I.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo selvagem 51N- 153+53; alelo mutado 51I - 206

**(B)- Identificação do polimorfismo C59R.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo selvagem 59C- 189+137; alelo mutado 59R- 163+137+27\*

**(C1)- Identificação do polimorfismo S108N.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo selvagem 108S- enzima *AluI*: 326 + 196

**(C2)- Identificação do polimorfismo S108N.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo mutado 108N- enzima *BSenI*: 331 +191

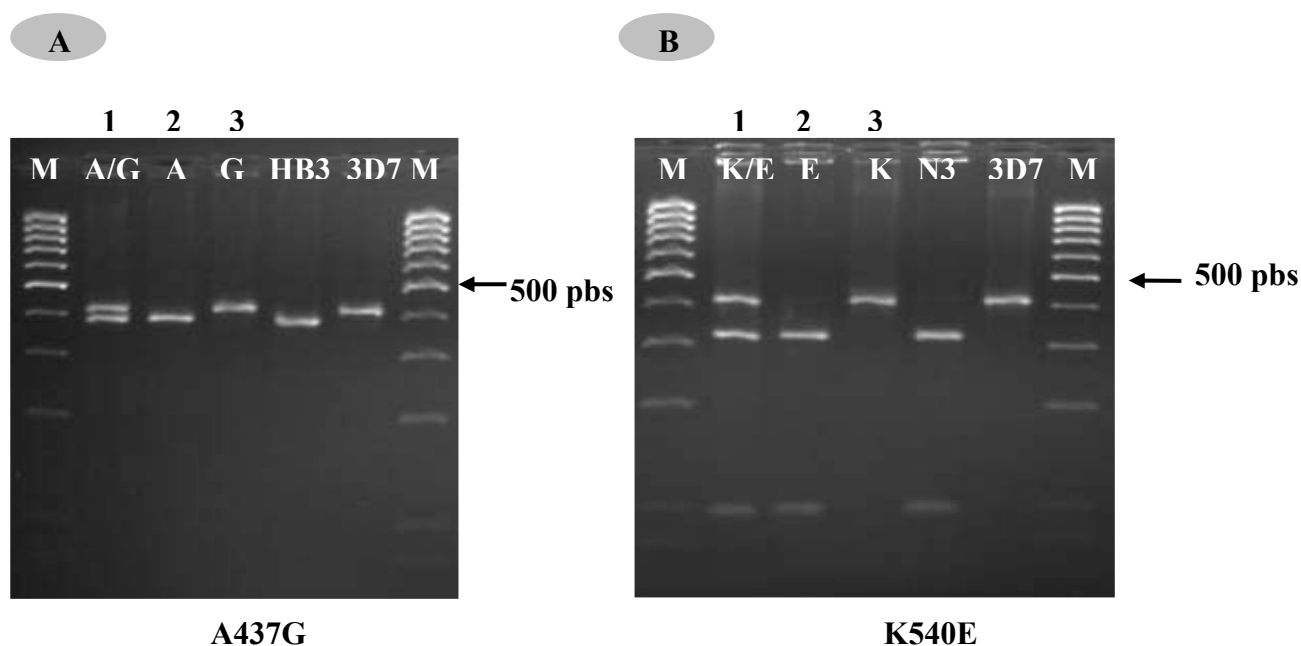
**(D)- Identificação do polimorfismo I164L.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo selvagem 164I – 245+171+106\*; alelo mutado 164N- 522 pb

M - marcador de peso molecular (Fermentes™); Hb3, Dd2, K1, 3D7 – Controlos de genótipo conhecido; 1,2,3 – Isolados de *P. falciparum*.

\*Bandas não visíveis no gel de agarose.

- **Gene *pf dhps***

Para a identificação do polimorfismo A437G a enzima *HpyF10VI* reconhece e corta na presença do alelo selvagem 437 A, resultado na geração de três fragmentos de 387, 32 e 19 pbs. Na presença do alelo mutado 437 G, a incubação com a enzima *HpyF10VI* origina dois fragmentos de 419 e 19 pbs. Foi usado como controlo positivo o clone 3D7 e como controlo positivo o clone HB3 (figura 18). Para a identificação do polimorfismo K540E incubaram-se os produtos de PCR contendo a posição 540 com a endonuclease *BsegI*. Na presença do alelo selvagem 540K, originou-se um fragmento inteiro de 438pbs, enquanto que na presença do alelo mutado 540E obtiveram-se dois fragmentos de 354 e 84pbs. Utilizou-se como controlo positivo o isolado N3 e como controlo negativo o clone 3D7 (figura 18).



**Figura 18** - Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para a identificação dos polimorfismos no gene *pf dhps* 437 e 540.

**(A) -Identificação do polimorfismo A437G.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo selvagem 437 A- 387+32\*+19\*; alelo mutado 437G - 419+19\*

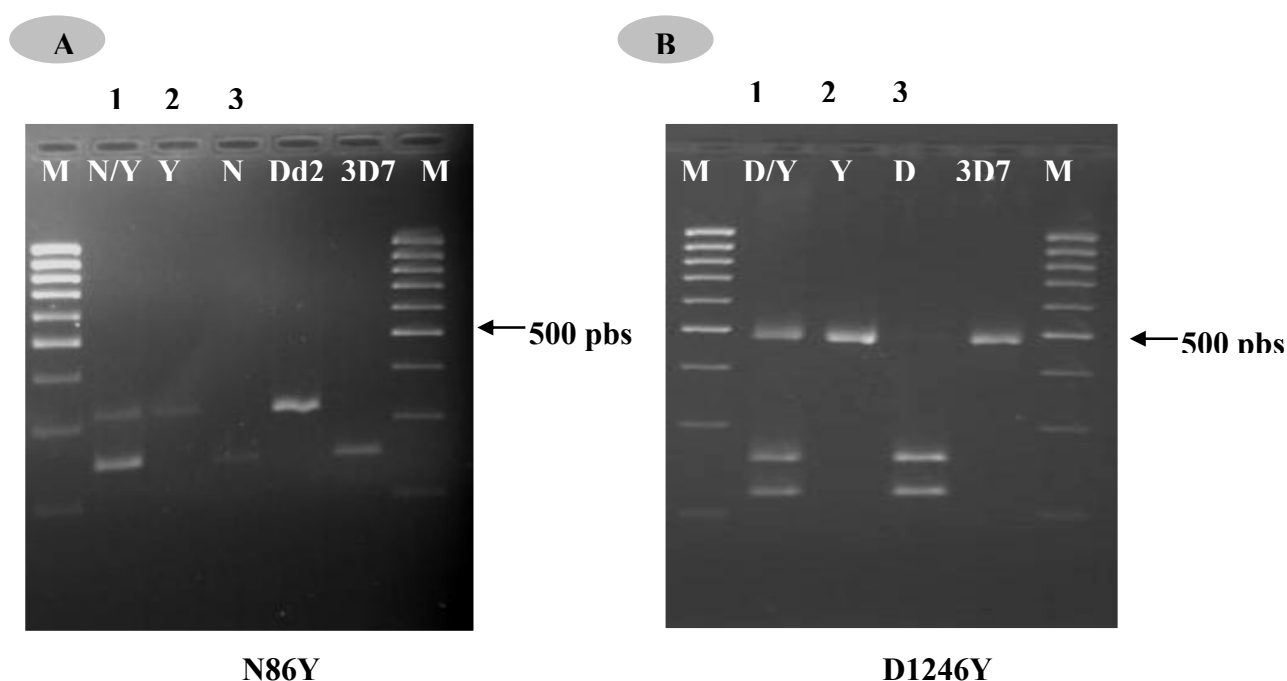
**(B)-Identificação do polimorfismo K540E.** Fragmentos esperados após restrição (pbs): alelo selvagem 540K – 438; alelo mutado – 354+84

M - marcador de peso molecular (Fermentes™); HB3, 3D7, N3 – Controlos de genótipo conhecido; 1,2,3 – Isolados de *P. falciparum*.

\*Bandas não visíveis no gel de agarose

- **Gene *pfmdr1***

Para a detecção do polimorfismo N86Y, a enzima *ApoI* restringiu as amostras que continham o alelo selvagem 86N, originando dois fragmentos com 249 e 72 pbs. Na presença do alelo mutado 86Y obteve-se um fragmento de 321pbs. Utilizou-se como controlo positivo o clone 3D7 e como controlo negativo foi usado DNA do clone Dd2 (figura 19). Para detecção do polimorfismo D1246Y utilizou-se a enzima *Eco32I* que reconhece e corta na presença do alelo mutado 1246Y originando dois fragmentos de 268 e 240 pbs. Na presença do alelo selvagem obtêm-se um fragmento de 508pbs. Utilizou-se como controlo negativo o clone 3D7 (figura 19).



**Figura 19** - Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para a identificação dos polimorfismos no gene *pfmdr1* 86 e 1246.

**(A)- Identificação do polimorfismo N86Y.** Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 86N – 249+72\*; alelo mutado 86Y – 321.

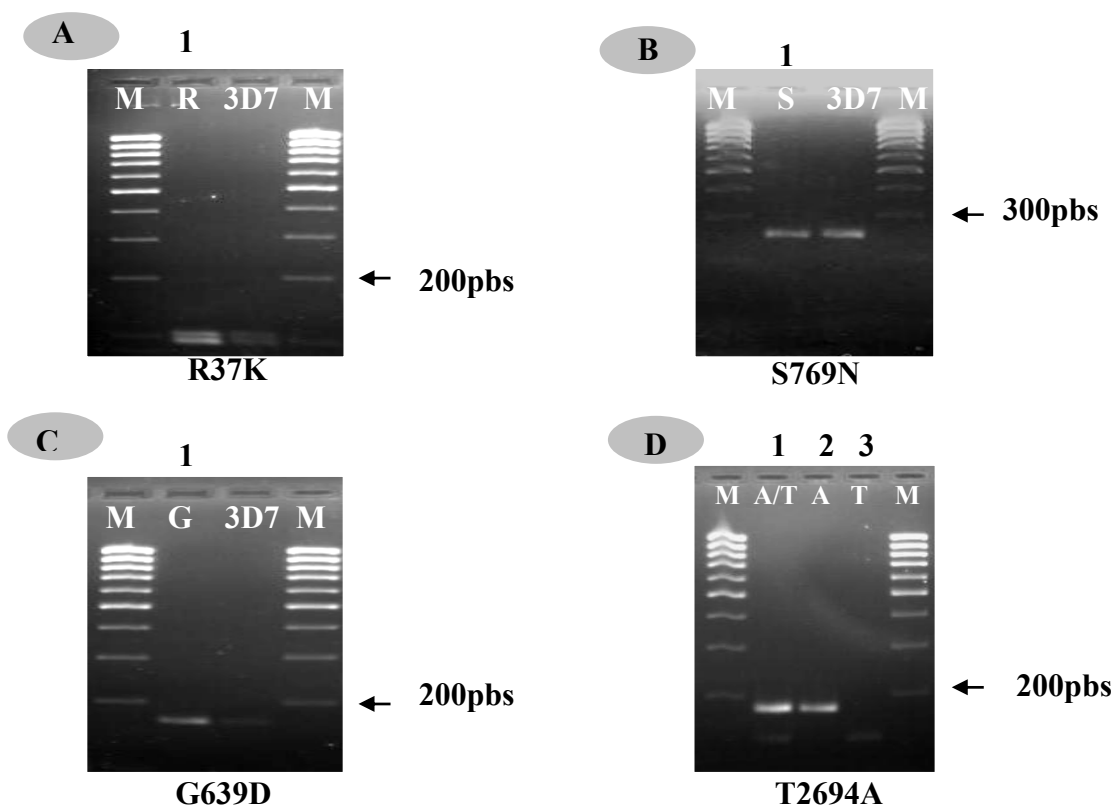
**(B)- Identificação do polimorfismo D1246Y.** Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 1246D – 508; alelo mutado 1246Y – 268+240.

M - marcador de peso molecular (Fermentes™); Dd2, 3D7 - Controlos de genótipo conhecido; 1,2,3 – Isolados de *P. falciparum*

\*Banda não visível no gel de agarose.

- **Gene *pfATPase6***

Para o gene *pfATPase6* foi realizada a técnica de PCR-RFLP com a finalidade de pesquisar a existência de eventuais polimorfismos já conhecidos bem como de outros ainda não descritos. Assim, foram analisados os polimorfismos R37K, S769N, G639D e T2694A nos nucleótidos 110, 769, 1916 e 2694, respectivamente. Foi identificada uma mutação sinónima T→A apenas no nucleótido 2694. Para esta mutação verificou-se que o polimorfismo genético criava um local de restrição para a enzima de restrição *TasI* (figura 20).



**Figura 20** - Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para a identificação dos polimorfismos no gene *pfATPase6*.

**(A)- Identificação do polimorfismo R37K.** Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 37R – 103 + 94 + 92 + 40\*; alelo mutado 37K -143+96+92.

**(B)-Identificação do polimorfismo S769N.** Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 769S – 250+22\*; alelo mutado 769N-272.

**(C)-Identificação do polimorfismo G639D.** Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 639G – 166; alelo mutado 639D-144+22\*.

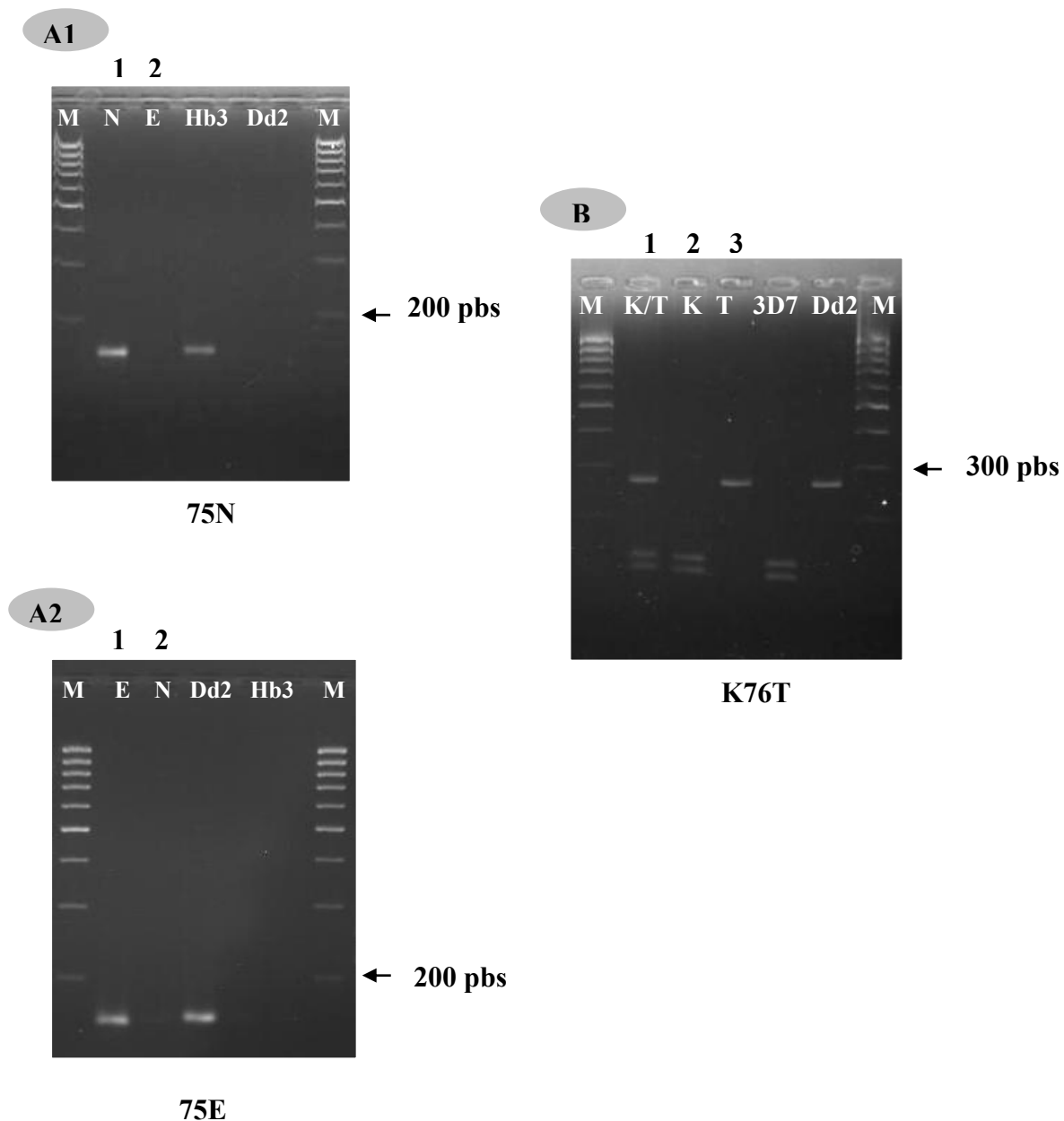
**(D)- Identificação do polimorfismo T2694A** (polimorfismo referente a um nucleótido); Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 2694T – 142+39\*+1\*; alelo mutado 2694A – 181+1\*. M- marcador de peso molecular (Fermentes™). 3D7– Controlo de genótipo conhecido; 1, 2,3 – Isolados de *P. falciparum*. \* - Bandas não visíveis no gel de agarose.



---

- **Gene *pfcrt***

Para a detecção do polimorfismo *pfcrt*N75E não foram utilizadas enzimas de restrição uma vez que o alelo selvagem 75N e o mutado 75E são distinguíveis apenas por PCR (ver ponto II.3.4.2.1). Cada amostra foi sujeita a duas amplificações por PCR: uma para detectar o alelo 75N e a outra para o alelo 75E. Infecções clonais geram um só produto amplificado numa das duas reacções, enquanto que infecções com mistura dos dois alelos irão gerar amplificações em ambos os PCRs. Assim, o tamanho do fragmento de PCR é igual quer seja o alelo mutado ou o selvagem, porque o local onde os *primers* emparelham é o mesmo existindo apenas três bases diferentes no *primer reverse*. Para detecção do polimorfismo K76T, a enzima *ApoI* pode reconhecer um ou dois locais de corte no fragmento do gene *pfcrt*. Quando restringidos, os fragmentos que contém o alelo selvagem, 76K, originam 3 fragmentos com 10, 124 e 137 pbs. Os fragmentos com o alelo mutado a treonina (76T) originam 2 fragmentos de 10 e 261 pbs (figura 21).



**Figura 21** - Géis de agarose (2%) correspondentes às electroforeses realizadas para a identificação dos polimorfismos no gene *pfCRT* 75 e 76.

**(A1)- Identificação do alelo selvagem 75N** – 159pbs.

**(A2)- Identificação do alelo mutado 75E** – 159pbs.

**(B)- Identificação do polimorfismo K76T.** Fragmentos esperados após a restrição (pbs): alelo selvagem 76K – 137+124+10\*; alelo mutado 76T – 261+10\*

M -marcador de peso molecular (Fermentes™); Dd2, 3D7, Hb3 – Controlos de genótipo conhecido; 1, 2, 3 – Isolados de *P. falciparum*.

\* Banda não visível no gel de agarose.

---

### III.3.2 - Isolados de pacientes tratados com sulfadoxina/pirimetamina

#### III.3.2.1 - Frequências alélicas

Para este grupo de isolados a identificação das frequências alélicas foi direcionada para os genes *dhfr* e *dhps*, de *P. falciparum*, relacionados com a resistência ao Fansidar®. Assim, cada um dos isolados foi caracterizado individualmente, relativamente aos polimorfismos nos genes *pfdhfr* (N51I, C59R, S108N) e *pfdhps* (A437G, K540E), através da técnica de PCR-RFLP. Para esta análise foram incluídas 74 amostras de D0 (antes do tratamento) e 73 de DC (depois o tratamento ou dia do controlo).

A amplificação dos genes em estudo verificou-se em todos isolados, de D0 e DC, ocorrendo desta forma uma eficiência de 100%. Na distribuição dos polimorfismos nos codões 51, 59 e 108, do gene *pfdhfr*, verificou-se uma predominância dos alelos mutados (51I, 59R e 108N), isoladamente, antes e depois do tratamento com Fansidar®, tendo-se verificado também a existência de alelos selvagens e misturas dos dois alelos em circulação (tabela 19).

Em relação aos polimorfismos nos codões 437 e 540, do gene *pfdhps*, observou-se uma distribuição equilibrada das prevalências dos alelos analisados (tabela 19). Particularmente, para o resíduo 437, verificou-se um aumento significativo do número de amostras contendo o alelo mutado (437G) depois do tratamento. Em contraste, para o mesmo resíduo, verificou-se uma diminuição de amostras contendo o alelo selvagem (437A) depois do tratamento. No caso do resíduo 540 verificou-se uma distribuição equilibrada dos alelos, antes e depois do tratamento com Fansidar® (tabela 19).

**Tabela 19** – Frequências alélicas dos genes *pfdhfr* e *pfdhps*

Alelo	Frequência		<i>p</i> (Fisher)
	Antes do tratamento (D0)	Depois do tratamento (DC)	
	N=74	N=73	
<i>pfdhfr</i> 51I	58 (78,4%)	58 (79,5%)	0,63
<i>pfdhfr</i> 51N	7 (9,5%)	9 (12,3%)	
51I+51N	9 (12,1%)	6 (8,2%)	
	N=74	N=73	
<i>pfdhfr</i> 5R9	61 (82,4%)	64 (87,7%)	0,37
<i>pfdhfr</i> 59C	8 (10,8%)	5 (6,8%)	
59R+59C	5 (6,8%)	4 (5,5%)	
	N=74	N=73	
<i>pfdhfr</i> 108N	66 (89,2%)	69 (94,5%)	0,23
<i>pfdhfr</i> 108S	5 (6,8%)	4 (5,5%)	
108N+108S	3 (4,0%)	0 (0,0%)	
	N=74	N=73	
<i>pfdhps</i> 437G	26 (35,1%)	37 (50,7%)	0,05
<i>pfdhps</i> 437A	32 (43,2%)	17 (23,3%)	
437G+ 437A	16 (21,7%)	19 (26,0%)	
	N=74	N=73	
<i>pfdhps</i> 540E	21 (28,4%)	21 (28,8%)	0,95
<i>pfdhps</i> 540K	31 (41,9%)	21 (28,8%)	
540E+ 540K	22 (29,7%)	31 (42,4%)	

Sendo o plasmódio um organismo haploíde ao longo de quase todo o seu ciclo de vida, com exceção para a fase de oocineto, a presença dos dois alelos no mesmo isolado, designado por mistura de alelos, corresponde à existência de pelo menos duas populações parasitárias distintas nesse isolado. Assim, na análise global do número de mutações foram incluídos os isolados que continham misturas dos dois alelos. Para esta análise verificou-se um aumento significativo de isolados contendo o alelo mutado 437G depois do tratamento (tabela 20).

**Tabela 20** - Prevalência de mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*

Gene	Codão	Antes do tratamento	Depois do tratamento	<i>p</i> (Fisher)
		Número de amostras com mutações /Total de isolados (%)		
<i>pfdhfr</i>	51	67/74 (90,5%)	64/73 (87,6%)	0,57
	59	66/74 (69,1%)	68/73 (93,1%)	0,39
	108	69/74 (93,2%)	69/73 (94,5%)	0,74
<i>pfdhps</i>	437	42/74 (56,7%)	56/73 (76,7%)	0,01
	540	43/74 (58,1%)	52/73 (71,2%)	0,09

### III.3.2.2 - Mutações múltiplas

Foram consideradas mutações múltiplas a presença de mais de uma mutação em um ou nos dois genes estudados. Foram analisados os genes *pfdhfr* e *pfdhps*, antes e depois do tratamento com Fansidar®. Todos isolados (74 antes e 73 depois do tratamento) apresentaram mutações múltiplas (tabela 21).

**Tabela 21** - Distribuição das mutações múltiplas nos isolados de *P.falciparum*

Mutações	Antes do tratamento	Depois do tratamento
<i>pfdhfr</i> (51I + 108N)	2	1
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N)	1	1
<i>pfdhps</i> (437G + 540E)	2	2
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> 540E	1	-
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> 437G	-	1
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R + 108N)	23	13
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R + 108N) + <i>pfdhps</i> 540E	3	-
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G + 540E)	1	3
<i>pfdhfr</i> (51I + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G + 540E)	2	-
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R + 108N) + <i>pfdhps</i> 437G	2	2
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R) + <i>pfdhps</i> (437G + 540E)	1	-
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G + 540E)	34	48

Tendo em conta o facto de o triplo mutante *pf dhfr* (51I, 59R e 108N) estar associado à falência terapêutica à S/P (Sibley *et al.*, 2001), associação esta reforçada pela presença adicional de mutações em *pf dhps* (437 G e 540 E), designado de quántuplo mutante (Nzila *et al.*, 2000; Bwijo *et al.*, 2003) decidiu-se fazer a análise destes conjuntos de mutações identificadas nos isolados estudados (tabela 21). Assim, em relação ao triplo mutante *pf dhfr* (51I, 59R e 108N), este foi identificado em 31% e 17,8%, antes e depois do tratamento, respectivamente. Para o quántuplo mutante *pf dhfr* (51I,59R e 108N) +*pdhps* (437G e 540E) a distribuição foi de 45,9% e 65,7%, antes e depois do tratamento, respectivamente. Verificou-se um aumento estatisticamente significativo de isolados contendo o quántuplo mutante depois do tratamento com Fansidar® (tabela 22).

**Tabela 22** - Prevalência do triplo mutante (*pf dhfr*) e quántuplo mutante (*pf dhfr* + *pf dhps*)

Gene	Alelos	Antes do tratamento	Depois do tratamento	<i>p</i> (Fisher)
		Número de mutações/Total de isolados (%)		
<i>pfdhfr</i>	51I/59R/108N (triplo mutante)	23/74 (31%)	13/73(17,8%)	0,06
<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i>	51I/59R/108N + 437G/540E (quíntuplo mutante)	34/74 (45,9%)	48/73 (65,7%)	0,01

### III.3.2.3 - Selecção de alelos mutados

No intuito de verificar a possível existência de selecção de alelos mutados depois do tratamento, foram identificados isolados com mutações triplas, no gene *pf dhfr*, e quántuplas nos genes *pf dhfr* e *pf dhps*, contendo misturas de alelos antes do tratamento. Para estes isolados foi verificado quantos possuíam mutações puras (apenas com alelos mutados) depois do tratamento. Verificou-se que em 80% para o triplo mutante (*pf dhfr*) e em 50% para o quántuplo mutante (*pf dhfr*+*pf dhps*) houve uma selecção dos alelos mutados depois do tratamento (tabela 23).

**Tabela 23** – Selecção de alelos mutados

	<b>Triplo mutante</b> <i>pfdhfr</i> (51,59,108)	<b>Quíntuplo mutante</b> <i>pfdhfr</i> (51,59,108) + <i>pfdhps</i> (437,540)
<b>Isolados com mistura de alelos</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Isolados com alelos mutados</b>	<b>4</b>	<b>3</b>

#### III.3.2.4 – Resumo

- Verificou-se a predominância dos alelos mutados para todas marcas estudadas do gene *pfdhfr*, antes e depois do tratamento com Fansidar ®.
- No gene *pfdhps* verificou-se uma distribuição equilibrada dos alelos, antes e depois do tratamento.
- Verificou-se um aumento significativo de isolados contendo o alelo mutado 437G, isoladamente, depois do tratamento.
- Verificou-se um aumento significativo do total de isolados contendo o alelo mutado 437G, depois do tratamento.
- Foram identificadas mutações múltiplas em todos isolados antes e depois do tratamento.
- Verificou-se um aumento significativo da frequência de isolados com o quádruplo mutante depois do tratamento.
- Observou-se a selecção de alelos mutados depois do tratamento.

---

### III.3.3 - Isolados de pacientes tratados com sulfadoxina/pirimetamina+amodiaquina

#### III.3.3.1 – Frequências alélicas

Para este grupo de isolados a identificação das frequências alélicas foi direcionada para os genes *pfdhfr* e *pfdhps*, relacionados com a resistência ao Fansidar®, e para o gene *pfmdr1* relacionado com a resistência à amodiaquina. Assim, cada um dos isolados foi caracterizado individualmente relativamente aos polimorfismos nos genes *pfdhfr* (N51I, C59R, S108N, I164L), *pfdhps* (A437, K540E) e *pfmdr1* (N86Y, D1246Y), através da técnica de PCR-RFLP.

A amplificação foi bem sucedida para os genes *pfdhfr* (51, 108 e 164), *pfdhps* (437 e 540) e *pfmdr1* (86 e 1246). Para codão 59, do gene *pfdhfr*, a caracterização dos polimorfismos não foi bem sucedida tendo-se verificado falha na amplificação em 2 isolados em D0 e 13 em DC. Sendo assim, o total de isolados analisados foi de 92 em D0 e 85 em DC, para todos os codões exceptuando o codão 59 para o qual o total de isolados analisados foi de 90 em D0 e 72 em DC.

Na análise do gene *pfdhfr*, a identificação dos polimorfismos nos codões 51, 59 e 108 mostrou predominância dos alelos mutados (51I, 59R e 108N), isoladamente, antes e depois do tratamento. Para este gene verificou-se também a existência de alelos selvagens e de misturas dos dois alelos nos codões analisados (tabela 24). Ainda no gene *pfdhfr*, para o codão 164 não se detectou a presença do alelo mutado 164L em todos isolados analisados, em D0 e DC, verificando-se uma predominância absoluta (100%) do alelo selvagem 164I (tabela 24).

Em relação aos polimorfismos nos codões 437 e 540, do gene *pfdhps*, não se verificaram grandes diferenças entre o número de isolados contendo alelos mutados e selvagens, antes e depois do tratamento. Ao contrário, os isolados contendo misturas de alelos foram menos frequentes (tabela 24).

Para o gene *pfmdr1*, a frequência do alelo mutado no codão 86 (86Y), antes e depois do tratamento, foi mais elevada em relação a do alelo selvagem ou da mistura dos dois alelos. No entanto, verificou-se uma diminuição significativa de isolados contendo o alelo mutado 86Y depois do tratamento. Na análise do codão 1246 verificou-se a predominância do alelo selvagem (1246 D) antes e depois do tratamento (tabela 24).



**Tabela 24** - Frequências alélicas dos genes *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfmdr1*

Alelo	Frequência		<i>p</i> (Fisher)
	Antes do tratamento (D0)	Depois do tratamento (DC)	
	N=92	N=85	
<i>pfdhfr</i> 51I	81(88%)	80 (94,1%)	0,15
<i>pfdhfr</i> 51N	6 (6,5%)	4 (4,7%)	
51I+51N	5 (5,5%)	1 (1,2%)	
	N=90	N=72	
<i>pfdhfr</i> 59R	81(90%)	71 (98,6%)	0,06
<i>pfdhfr</i> 59C	6 (6,6%)	1 (1,4%)	
59R+59C	3 (3,4%)	0 (0,0%)	
	N=92	N=85	
<i>pfdhfr</i> 108N	87 (95%)	84 (98,8%)	0,11
<i>pfdhfr</i> 108S	2 (2,2%)	0 (0,0%)	
108N+108S	3 (2,8%)	1 (1,2%)	
	N=92	N=85	
<i>pfdhfr</i> 164L	0 (0%)	0 (0%)	-----
<i>pfdhfr</i> 164I	92 (100%)	85 (100%)	
164L+164I	0 (0%)	0 (0%)	
	N=92	N=85	
<i>pfdhps</i> 437G	49 (53,3%)	37 (43,5%)	0,19
<i>pfdhps</i> 437A	32 (34,8%)	12 (14,1%)	
437G+ 437 <sup>a</sup>	11 (11,9%)	36 (42,4%)	
	N=92	N=85	
<i>pfdhps</i> 540E	37 (40,2%)	30 (35,3%)	0,49
<i>pfdhps</i> 540K	39 (42,2%)	40 (47,1%)	
540E+ 540K	16 (17,4%)	15 (17,6%)	
	N=92	N=85	
<i>pfmdr1</i> 86Y	55(59,8%)	35 (41,2%)	0,01
<i>pfmdr1</i> 86N	21(21,8%)	15 (17,6%)	
86Y+ 86N	17 (18,4%)	35 (41,2%)	
	N=92	N=85	
<i>pfmdr1</i> 1246Y	7 (7,6%)	5 (5,9%)	0,66
<i>pfmdr1</i> 1246D	71 (77,1%)	65 (76,5%)	
Y1246+ D1246	14 (15,3%)	14 (17,6%)	

Na análise global do número de mutações foram incluídos os isolados que continham misturas dos dois alelos. Para esta análise verificou-se um aumento significativo de isolados contendo o alelo mutado 437G, depois do tratamento (tabela 25).

**Tabela 25** - Prevalência de mutações nos genes *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfmdr1*

Gene	Codão	Antes do tratamento	Depois do tratamento	<i>p</i> (Fisher)
		Número de mutações/Total de isolados (%)		
<i>pfdhfr</i>	51	86/92 (93,4%)	81/85 (95,2%)	0,60
	59	84/90 (93,3%)	71/72 (98,6%)	0,10
	108	90/92 (97,8%)	85/85 (100%)	0,17
	164	0/92 (0%)	0/85 (0%)	-----
<i>pfdhps</i>	437	60/92 (65,2%)	73/85 (85,8%)	0,001
	540	53/92 (57,6%)	45/85 (52,9%)	0,53
<i>pfmdr1</i>	86	72/92 (78,2%)	70/85 (82,3%)	0,49
	1246	21/92 (22,8%)	19/85 (22,3%)	0,94

### III.3.3.2 – Mutações múltiplas

Analisou-se a presença de mutações múltiplas, em *pfdhfr*, *pfdhps* e *pfmdr1*, antes e depois do tratamento com Fansidar®+amodiaquina. Todos isolados apresentaram mutações múltiplas antes e depois do tratamento. A análise foi realizada para os genes isoladamente e em combinação. Para o gene *pfmdr1* não se identificaram mutações isoladas, nos codões 86 e 1246, estando estas sempre associadas às mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* (tabela 26).

**Tabela 26** - Distribuição das mutações múltiplas nos isolados de *P. falciparum*

Mutações	Antes do tratamento	Após o tratamento
<i>pfdhfr</i> (59R)+ <i>pfmdr1</i> (1246Y)	1	-
<i>pfdhfr</i> (51I)+ <i>pfmdr1</i> (86Y+1246Y)	1	-
<i>pfdhfr</i> (51I + 108N)	1	-
<i>pfdhfr</i> (51I + 108N)+ <i>pfmdr1</i> (1246Y)	1	-
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N)	3	-
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G)	-	2
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G) )+ <i>pfmdr1</i> (86Y)	1	5
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G)+ <i>pfmdr1</i> (86Y+1246Y)	2	3
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R +108N)	21	6
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R +108N) + <i>pfmdr1</i> (1246Y)	5	5
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R +108N) + <i>pfmdr1</i> (86Y)	18	10
<i>pfdhfr</i> (51I + 59R +108N) + <i>pfmdr1</i> (86Y+1246Y)	5	3
<i>pfdhfr</i> (59R) + <i>pfdhps</i> (437G +540E)	1	-
<i>pfdhfr</i> (108N) + <i>pfdhps</i> (437G+ 540E)	-	1
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G+ 540E)+ <i>pfmdr1</i> (1246Y)	1	2
<i>pfdhfr</i> (59R + 108N) + <i>pfdhps</i> (437G+ 540E)+ <i>pfmdr1</i> (86Y)	4	2
<i>pfdhfr</i> (51I +108N )+ <i>pfdhps</i> (437G +540E)	3	-
<i>pfdhfr</i> (51I +108N )+ <i>pfdhps</i> (437G +540E)+ <i>pfmdr1</i> (86Y)	1	-
<i>pfdhfr</i> (51I +59R +108N) + <i>pfdhps</i> (437G)	4	19
<i>pfdhfr</i> (51I +59R +108N) + <i>pfdhps</i> (437G)+ <i>pfmdr1</i> (86Y)	9	3
<i>pfdhfr</i> (51I +59R +108N) + <i>pfdhps</i> (437G)+ <i>pfmdr1</i> (1246Y)	1	3
<i>pfdhfr</i> (51I +59R + 108N)+ <i>pfdhps</i> (437G +540E)	37	26
<i>pfdhfr</i> (51I +59R + 108N)+ <i>pfdhps</i> (437G+540E) + <i>pfmdr1</i> (1246 Y)	10	6
<i>pfdhfr</i> (51I +59R + 108N)+ <i>pfdhps</i> (437G+540E) + <i>pfmdr1</i> (86 Y)	41	26
<i>pfdhfr</i> (51I +59R + 108N)+ <i>pfdhps</i> (437G+540E) + <i>pfmdr1</i> (86 Y+1246Y)	12	8

Em relação ao triplo mutante *pfdhfr* (51I, 59R,108N), este foi identificado em 22,8% e 7%, antes e depois do tratamento, respectivamente. Para o quádruplo mutante *pfdhfr* (51I,59R,108N) +*pfdhps* (437G, 540E) a distribuição foi de 40,2% e 30,5%, antes e depois do tratamento, respectivamente (tabela 27). Verificaram-se tendências significativas apenas para os isolados contendo o triplo mutante *pfdhfr* e o quádruplo mutante *pfdhfr*+*pfdhps* associado à mutação *pfmdr1* 86 (tabela 27).

**Tabela 27** - Prevalência do triplo mutante (*pfdhfr*) e do quádruplo mutante (*pfdhfr*+ *pfdhps*) associado às mutações no gene *pfmdr1*

Gene	Alelos	Antes do tratamento	Depois do tratamento	<i>p</i> (Fisher)
		Número de mutações/Total de isolados (%)		
<i>pfdhfr</i>	51I/59R/108N (triplo mutante)	21/92 (22,8%)	6/85(7%)	0,05
<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i>	51I/59R/108N + 437G/540E (quíntuplo mutante)	37/92 (40,2%)	26/85 (30,5%)	
<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i> + <i>pfmdr1</i>	51I/59R/108N + 437G/540E + 1246Y	10/92 (10,9%)	6/85 (7%)	
<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i> + <i>pfmdr1</i>	51I/59R/108N + 437G/540E + 86Y	41/92 (44,5%)	26/85 (30,5%)	0.01
<i>pfdhfr</i> + <i>pfdhps</i> + <i>pfmdr1</i>	51I/59R/108N + 437G/540E + 86Y/1246Y	12 (13,0%)	8 (9,4%)	

### III.3.3.3 - Selecção de alelos mutados

Tal como para os isolados de pacientes tratados com Fansidar<sup>®</sup>, foi verificada a possível existência de selecção de alelos mutados depois do tratamento. Assim, foram identificados isolados com mutações triplas, no gene *pfdhfr*, e quintuplas nos genes *pfdhfr* e *pfdhps*, contendo misturas de alelos antes do tratamento. Para estes isolados foi verificado quantos possuíam mutações puras (apenas com alelos mutados) depois do tratamento. Verificou-se que em 85,7% para o triplo mutante (*pfdhfr*) e em 33,3% para o quintuplo mutante (*pfdhfr*+*pfdhps*) houve selecção dos alelos mutados depois do tratamento (tabela 28).

**Tabela 28** – Selecção de alelos mutados

	<b>Triplo mutante</b> <i>pfdhfr</i> (51,59,108)	<b>Quintuplo mutante</b> <i>pfdhfr</i> (51,59,108) + <i>pfdhps</i> (437,540)
<b>Isolados com mistura de alelos</b>	<b>7</b>	<b>15</b>
<b>Isolados com alelos mutados</b>	<b>6</b>	<b>5</b>

### III.3.3.4 – Resumo

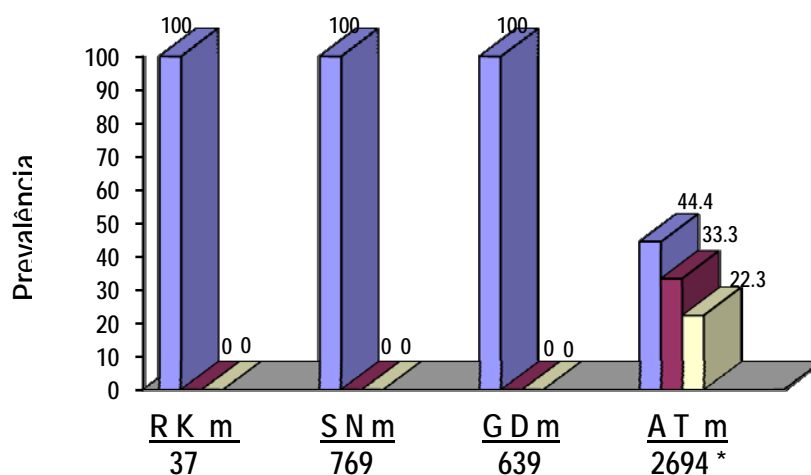
- Verificou-se uma predominância dos alelos mutados, antes e depois do tratamento, em todos codões do gene *pfdhfr*, exceptuando no codão 164.
- No codão 164, do gene *pfdhfr*, foi identificado apenas o alelo selvagem 164L em todos isolados.
- Verificou-se um aumento significativo do total de isolados contendo o alelo mutado 437G, depois do tratamento
- Verificou-se uma redução significativa de isolados contendo o alelo mutado 86Y, isoladamente, depois do tratamento.
- Foram identificadas mutações múltiplas, em todos isolados, antes e depois do tratamento.
- Verificou-se uma diminuição significativa da frequência do triplo mutante (*pfdhfr*) e do quintuplo mutante (*pfdhfr*+*pfdhps*) associado à mutação *pfmdr1* 86Y, depois do tratamento.
- Observou-se a selecção de alelos mutados depois do tratamento.

### III.3.4- Isolados de pacientes tratados com sulfadoxina/pirimetamina+artesunato

#### III.3.4.1- Análise dos SNPs no gene *pfATPase6*

A emergência e disseminação da resistência do *P. falciparum* aos antimaláricos mais comuns como a cloroquina e a sulfadoxina/pirimetamina tem colocado sérios desafios no controlo da malária nas áreas endêmicas. Assim, tem sido recomendação da OMS o uso de terapias combinadas com artemisinina (ACTs) e seus derivados, como primeira linha de tratamento da malária na África sub-Sahariana (W.H.O., 2006b). Moçambique adoptou, em 2004, associações terapêuticas à base de artemisinina (ACTs) e seus derivados como primeira linha de tratamento da malária no País. Neste âmbito, entendeu-se fazer uma análise dos polimorfismos no gene *pfATPase6*, em isolados de pacientes com malária não complicada tratados com a combinação Fansidar®+artesunato.

A análise incluiu 20 isolados antes (D0) e 6 depois do tratamento (DC), correspondentes aos isolados positivos para *P. falciparum* (tabela 16). Recorrendo à técnica de PCR-RFLP foram analisados os polimorfismos R37K, S769N, G639D e T2694A. Para os polimorfismos S769N e T2694A verificou-se uma limitação na técnica na amplificação tendo esta sido realizada com sucesso em apenas 18 isolados. Para os 6 isolados positivos de DC a amplificação foi realizada com sucesso em todos SNPs estudados. O resultado desta análise mostrou uma diversidade limitada observando-se, apenas no nucleótido 2694, mutações sinónimas (T-A) antes e depois do tratamento. A prevalência destes SNPs, em D0, está representada na figura 22.



**Figura 22** - Prevalência dos SNPs analisados no gene *pfATPase6* antes do tratamento. Alelos selvagens – 2694T\*, 37R, 639G, 769S; alelos mutados – 2694A\*, 37K, 639D, 769N; m: mistura de alelos; \* Referente a um nucleótido, não ao número dum aminoácido.

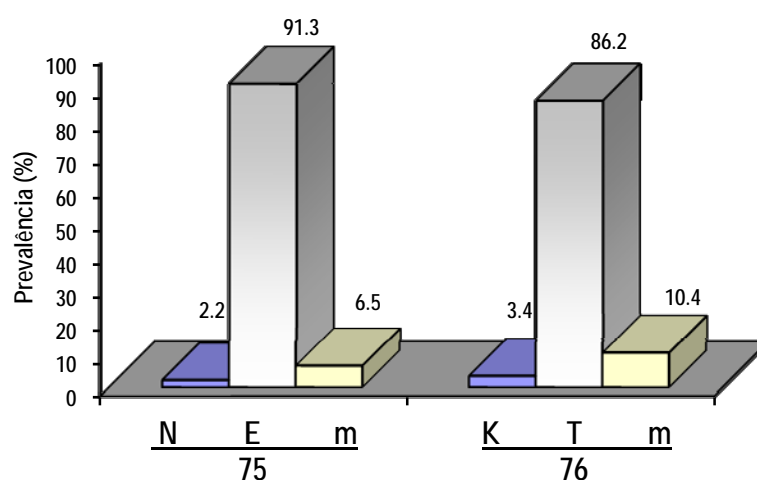
### III.3.4.2 - Resumo

- Observaram-se mutações sinónimas apenas no nucleótido 2694, antes e depois do tratamento. Nos restantes nucleótidos analisados (110, 769 e 1916) não se verificaram polimorfismos genéticos.

### III.3.5 - Análise dos polimorfismos no gene *pfcr*

O uso da cloroquina, em Moçambique, foi abandonado no ano 2002 devido a existência de resistências em *P. falciparum* para este antimalárico. Para melhor documentar este aspecto foram pesquisadas as mutações N75E e K76T recorrendo à técnica de PCR-RFLP tendo a amplificação ocorrido com sucesso em todos isolados.

Os isolados analisados foram em número de 92 para N75E e 29 para K76T. De um modo geral observou-se uma predominância dos alelos mutados 75E e 76T demonstrando que as duas mutações se encontram fixas na população parasitária local. Verificou-se também a existência de parasitas portadores de alelos selvagens e com misturas dos dois alelos (figura 23).



**Figura 23** - Prevalências dos alelos do gene *pfcr* (m – mistura de alelos; alelos selvagens –75N e 76K; alelos mutados –75E e 76T).

#### III.3.5.1- Resumo

- Verificou-se uma predominância de isolados com alelos mutados nos genes *pfcr* 75E (91,3%) e *pfcr* 76T (86,2%).
- Verificaram-se também isolados com misturas de alelos e com alelos selvagens.

---

### III.3.6 - Estudo dos marcadores moleculares do hospedeiro relacionados com susceptibilidade/resistência à malária

A análise dos marcadores moleculares de susceptibilidade do hospedeiro foi realizada em colaboração com o departamento de genética populacional do Instituto de Patologia molecular e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal. Foram envolvidos dois grupos de pacientes, com diferentes formas de malária, e um grupo de pacientes sem malária, segundo a distribuição exemplificada abaixo:

- ✓ Pacientes com malária não complicada (n=77)
- ✓ Pacientes com malária grave e/ou complicada (n=41)
- ✓ Crianças sem malária (n=21)

Devido a limitações de tempo, foram apenas analisados dois marcadores moleculares relacionados com a susceptibilidade do hospedeiro à malária, nomeadamente o CD36 e o ICAM-1.

#### III.3.6.1 - Análise da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> no gene *ICAM-1*

A molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) é uma glicoproteína glicosilada da membrana com 80–114 kDa, constituída por cinco domínios “Ig-like”, expressa na superfície de uma grande variedade de células. Esta molécula tem sido referida como estando particularmente envolvida na fisiopatologia da malária (Tse *et al.*, 2004). A ICAM-1 tem sido referida como estando particularmente envolvida na fisiopatologia da malária cerebral, sendo a patogenicidade de *P. falciparum* associada a capacidade dos eritrócitos parasitados aderirem ao endotélio capilar (MacPherson *et al.*, 1985; Pasloske *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1994; Newbold *et al.*, 1997). Estudos histopatológicos (Turner *et al.*, 1994) demonstraram a presença de eritrócitos parasitados nos vasos cerebrais em co-localização com a molécula ICAM-1, associação esta reforçada pelos resultados de um outro estudo onde a adesão de eritrócitos infectados, por *P. falciparum*, à molécula ICAM-1 foi elevada em pacientes com malária cerebral quando comparada com indivíduos assintomáticos do controlo (Newbold *et al.*, 1997).

Na mutação no gene *ICAM-1* (mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup>) há uma alteração de A para T que afecta a sequência dos amino-ácido Lys para Met na posição 29 (K29M). No presente trabalho procurou-se contribuir para a descrição e interpretação da diversidade do gene *ICAM-1* em populações com diferentes formas clínicas de malária. Em particular, procedeu-se à análise da distribuição populacional da mutação Kilifi K29M. A análise da distribuição dos polimorfismos do gene *ICAM-1* está resumida na tabela 29.



**Tabela 29** - Distribuição dos polimorfismos no gene *ICAM-1*

	Genótipos		
	K29/K29	K29/M29 (m)	M29/M29
Sem malária	10/14 (71,4%)	2/14 (14,3%)	2/14 (14,3%)
Malária não complicada	28/56 (50%)	15/56 (26,8%)	13/56 (23,2%)
Malária grave e/ou complicada	16/29 (55,2%)	8/29 (27,6%)	5/29 (17,2%)

K – alelo selvagem; M – alelo mutado; m- mistura de alelos

Ao fazer-se a comparação entre o número total de isolados com o alelo mutado e selvagem, os resultados mostraram que no grupo de pacientes com malária sem complicações 28 pacientes eram portadores da mutação *ICAM-1*<sup>Kilifi</sup>, enquanto que 28 pacientes tinham alelos selvagens para o *ICAM-1*. No grupo de pacientes com malária grave e/ou complicada, 13 pacientes eram portadores da mutação *ICAM-1*<sup>Kilifi</sup> (8 homozigóticos e 5 heterozigóticos), enquanto que 16 pacientes possuíam alelos não-mutados para o *ICAM-1* (tabela 30). Parece haver uma correlação significativa entre a ausência de malária e a ausência do alelo mutante (tabela 30).

**Tabela 30** – Distribuição dos alelos mutados e não-mutados no gene *ICAM-1*

	Genótipos		<i>p</i> (Chi-Square)
	Não-mutado	Mutado	
Sem malária	10/14	4/14	0,02
Malária não complicada	28/56	28/56	0,14
Malária grave e/ou complicada	16/29	13/29	0,15

### III.3.6.2 - Análise da mutação T1264G no gene *CD36*

O gene *CD36* parece estar envolvido no processo de sequestração podendo deste modo contribuir para a resposta do hospedeiro à infecção malárica. A mutação T1264G introduz um codão de terminação no gene *CD36* causando deficiência da proteína com efeitos na resistência/susceptibilidade à malária ainda não completamente esclarecidos (Pain *et al* 2001).

Tendo em conta que a mutação T1264G atinge frequências polimórficas em África (Aitman *et al*, 2000), entendeu-se fazer um rastreio de isolados de sangue de pacientes com diferentes formas clínicas de malária, e de um grupo control sem malária, de modo a contribuir para a descrição da diversidade do gene *CD36*. Na figura 24 estão ilustrados os padrões de digestão do fragmento do exão 10 com a enzima *NdeI*, que permite detectar a mutação T1264G. Na presença do alelo selvagem existe um local de restrição para a enzima, o que origina dois fragmentos de 148 pbs e 65 pbs (não visível), a partir do fragmento inicial de 213 pbs que não é digerido na presença da mutação.



**Figura 24** - Padrões de digestão dos fragmentos do exão 10 com a enzima *NdeI*

No grupo de pacientes sem infecção malárica não se identificaram portadores da mutação T1264G. No grupo de malária não complicada e de malária grave e/ou complicada, 6,5% e 12,5% dos isolados possuíam o alelo mutado na forma heterozigótica, respectivamente. O alelo selvagem apresentou frequências de 100%, 93,5% e 87,5%, para o grupo sem malária, com malária não complicada e com malária grave e/ou complicada, respectivamente. Os resultados desta análise estão representados na tabela 31.

**Tabela 31** - Distribuição dos polimorfismos no gene *CD36*

	Genótipos		
	Não-mutado	Mistura de alelos	Mutado
<b>Sem malária</b>	21/21 (100%)	0/21 (0%)	0/21(0%)
<b>Malária não complicada</b>	72/77 (93,5%)	5/77 (6,5%)	0/77(0%)
<b>Malária grave e/ou complicada</b>	35/40 (87,5%)	5/40 (12,5%)	0/40(0%)

### III.3.6.3- Resumo

#### Gene *ICAM-1*

- A frequência do alelo mutado (*ICAM-1* Kilifi) foi menor no grupo de indivíduos sem malária.
- Não se verificou nenhuma correlação significativa entre a distribuição dos alelos, nos isolados de pacientes com malária não complicada e com malária grave e/ou complicada.

#### Gene *CD36*

- O alelo selvagem foi predominante nos dois genes;
- O alelo mutado, na forma homozigótica, não foi identificado em nenhum dos grupos analisados;
- A mutação T1264G foi verificada apenas associada à malária.

Por limitações de tempo não foi realizada a análise molecular dos polimorfismos em outros genes relacionados com a susceptibilidade/resistência à malária (ex: *TNF- $\alpha$* , *G6PD*, *NOS2*).

---

### III.3.7 - Estudo dos factores genéticos humanos associados ao metabolismo de fármacos antimaláricos

#### III.3.7.1 - Determinação dos polimorfismos no gene *CYP2C8*.

A família CYP-450 apresenta uma grande variabilidade genética estando descritos alguns genes associados à alteração da actividade metabólica de vários fármacos (Rahman *et al.*, 1994; Yamazaki *et al.*, 1999; Ohyama *et al.*, 2000). A terapia combinada para a malária, utilizando fármacos com diferentes mecanismos de acção, tem sido proposta como uma estratégia para o controlo desta doença (Björkman., 2002). Um potencial candidato para as combinações terapêuticas é a amodiaquina uma vez que, para além do baixo custo, esta é ainda eficaz contra os parasitas resistentes à cloroquina e à sulfadoxina/pirimetamina (Cavaco *et al.*, 2005). No entanto, a incidência dos efeitos colaterais (ex: agranulocitose, hepatotoxicidade) têm limitado a sua utilização (Olliaro *et al.*, 1996). Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento do gene *CYP2C8* na metabolização hepática da amodiaquina (Cavaco *et al.*, 2005; Nakajima *et al.*, 2003; Li XQ *et al.*, 2002).

Em Moçambique, a amodiaquina, em combinação com o Fansidar ®, foi utilizada durante cerca de dois anos como primeira linha de tratamento da malária no País, tendo o seu uso sido abandonado principalmente devido aos efeitos colaterais adversos. No entanto, não é de se descartar a hipótese da sua re-introdução, em terapia combinada, associado à artemisinina ou seus derivados. Foi objectivo desta análise, efectuada em colaboração com o Centro de Biomedicina Estrutural e Molecular da Universidade do Algarve, Portugal, verificar a heterogenicidade do gene *CYP2C8* num grupo de crianças com malária não complicada, em Moçambique.

Analisaram-se 92 isolados de *P. falciparum* para os quais foram determinadas as frequências dos polimorfismos no gene *CYP2C8* (*CYP2C8*\*2, *CYP2C8*\*3 e *CYP2C8*\*4), nomeadamente: A805T (Ile269Phe, *CYP2C8*\*2), C792G (Ile264Met, *CYP2C8*\*4) e A1196G (Lys399Arg, *CYP2C8*\*3)(tabela 32).

**Tabela 32** – Frequências dos SNPs de *CYP2C8* em isolados de indivíduos infectados com malária

SNP	GENÓTIPO	Nº de isolados(%)
A805T	A/A	51 (59%)
	A/T	33 (38%)
	T/T	3 (3%)
A1196G	A/A	77 (84%)
	A/G	15 (16%)
	G/G	0
C792G	C/C	85 (98%)
	C/G	2 (2%)
	G/G	0

### III.3.7. 2 – Resumo

- Para o polimorfismo A805T (*CYP2C8*\*2), 38% dos isolados eram heterozigóticos e 3% homozigóticos para o alelo mutado.
- Relativamente aos polimorfismos A1196G (*CYP2C8*\*3) e C792G (*CYP2C8*\*4), 16% e 2% dos isolados, respectivamente, eram heterozigóticos para o alelo mutado. Não foram identificadas formas homozigóticas para os alelos mutados.
- Para os três polimorfismos o alelo selvagem, na forma homozigótica, foi predominante.

---

## **CAPÍTULO IV**

---

## IV- DISCUSSÃO

Na República de Moçambique, a malária é endémica afectando principalmente crianças com menos de 5 anos de idade e mulheres grávidas (INS, MISAU., 2002). Os programas de controlo da malária no País, remontam à década de 50, aquando do início do programa global de “erradicação da malária”. A guerra civil em que o País esteve mergulhado nos anos 70 levou a uma instabilidade e destruição do sistema de saúde no País, incluindo do programa de controlo da malária. Com a cessação das hostilidades nos anos 90, duas décadas depois, houve um interesse renovado no controlo da malária com a introdução de programas anti vectoriais, através da pulverização intra domiciliar com insecticidas, complementado com o tratamento dos casos, a nível das capitais provinciais, e subordinado aos programas recomendados pela OMS.

O Programa Nacional de Controlo da Malária (PNCM) foi criado em 1982, tendo sido desenvolvido posteriormente com a adopção de 3 estratégias principais, nomeadamente: a) diagnóstico precoce da malária (clínico e laboratorial) e tratamento adequado; b) controlo vectorial e c) educação para a saúde. Estes esforços foram incrementados em 1999, com uma parceria global entre várias organizações, nomeadamente, o Roll Back Malaria (RBM), OMS, UNICEF, Banco Mundial e o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), que envolveu a comunidade na participação activa de actividades preventivas de controlo (Africa Malaria Report., 2003). Esta estratégia de parceria global (2002-2005) teve como consequência a redução da morbimortalidade atribuída a malária, principalmente no grupo etário abaixo dos 5 anos de idade.

A partir do ano 1999, com a Iniciativa Espacial de Desenvolvimento do Lubombo (LSDI), um projecto regional conjunto entre Moçambique, Swazilândia e África do Sul, para o controlo da malária, iniciou-se a realização de várias actividades em simultâneo tais como o controlo do vector, através da pulverização intradomiciliar (IRS), e a utilização de derivados dos ACTs para o tratamento dos casos (<http://www.malaria.org.za/lsgi/>).

Este projecto abrange, para além das regiões ao sul de Moçambique, as áreas fronteiriças com a Swazilândia e a África do Sul. Uma investigação recente, realizada no âmbito do projecto LSDI, mostrou uma redução significativa da prevalência parasitária em Moçambique, atribuída a pulverização intra domiciliar com insecticida a base de carbamatos (Sharp *et al.*, 2007).

Apesar de todos esforços direccionados ao controlo desta infecção, a malária constitui ainda um grave problema de saúde pública em todo País. Actualmente, a malária é considerada uma prioridade para o governo de Moçambique, e como tal, está a ser desenvolvido um novo plano estratégico nacional de combate a esta doença tendo em consideração aspectos tais como a importância de outras doenças infecto-contagiosas no País, o crescimento da população e sobretudo,

---

as inúmeras catástrofes naturais que têm obrigado a uma movimentação da população para novos locais de residência criando dificuldades na implementação de programas de controlo.

O presente estudo foi realizado em três unidades sanitárias da Província de Maputo, nomeadamente o Hospital Central de Maputo, o Centro de Saúde de Bagamoyo e o Centro de Saúde de Boane. O trabalho consistiu em: a) observação clínica dos pacientes, colheita de amostras, e observação do tratamento instituído, tendo decorrido em 3 etapas (períodos) correspondentes às épocas de maior transmissão da malária no País (Dezembro à Abril) e; b) estudo laboratorial onde se realizaram as análises moleculares necessárias à genotipagem.

Assim, foram envolvidas instituições Moçambicanas e Portuguesas nomeadamente: a) a Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane em Maputo, Moçambique, no tratamento das amostras e análise microscópica; c) o laboratório do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT-LA), no Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, Portugal, nos estudos de resistência aos antimaláricos; c) o Instituto de Patologia molecular e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP), Portugal, no estudo dos moleculares de susceptibilidade/resistência do hospedeiro à malária e, d) o Centro de Biomedicina Estrutural e Molecular da Universidade do Algarve, Portugal, no estudo dos factores genéticos humanos associados ao metabolismo dos fármacos antimaláricos.

**O capítulo da discussão será apresentado em cinco sub-capítulos distintos em função de cada um dos objectivos iniciais e linhas de trabalho realizadas.**

#### **IV.1 - Identificação das espécies de plasmódios**

Para a identificação da espécie de plasmódio infectante foram utilizadas duas técnicas, nomeadamente: a microscopia óptica (MO) e a técnica de PCR. Ficou aqui confirmada a elevada sensibilidade da técnica de PCR quando comparada com a técnica de M.O, o que está de acordo com investigações prévias nesta área (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999). A diferença de sensibilidade entre as duas técnicas permite questionar a relevância da técnica de PCR, onerosa, em comparação com a M.O, na medida em que o limite de detecção dos parasitas desta fica muito aquém do da técnica de PCR afectando a informação científica obtida. No nosso estudo a única espécie de plasmódio identificada foi o *P. falciparum*, o que está de acordo com a literatura local (PNCM, MISAU) embora existam casos de *P. malariae* e de *P. ovale* descritos nos relatórios nacionais (INS., 1981; PNCM, MISAU).



---

Foram aqui identificadas, por PCR, altas prevalências de *P. falciparum* depois do tratamento tanto com sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®) como com terapia combinada de sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®) +amodiaquina. Do total de 186 amostras positivas para *P. falciparum*, antes do tratamento, 32 (17,2%) e 164 (88,2%) continuavam positivas depois do tratamento, na análise por M.O e PCR, respectivamente. Ainda na análise por PCR, com base o tratamento efectuado, verificou-se que a frequência de amostras positivas, para *P. falciparum*, depois do tratamento era mais elevada no grupo tratado com Fansidar® (98%), seguindo-se o grupo tratado com Fansidar®+amodiaquina (92,3%) e o grupo tratado com Fansidar®+artesunato (30%).

Na verdade, apesar da análise por M.O ter identificado em algumas amostras a presença de *P. falciparum* depois do tratamento, com os medicamentos acima citados, a maior parte dos casos foram negativos tendo sido considerados como parasitológicamente curados. Isto significa que, devido ao baixo limite de detecção da M.O, muitos pacientes são considerados como “curados” depois do tratamento antimalárico, o que não é completamente correcto. A permanência de baixos níveis de parasitas na circulação sanguínea, não identificados através do diagnóstico laboratorial de rotina (M.O), pode originar situações como o surgimento de recrudescências, a malária grave, a malária crónica, o sequestro em órgãos, o agravamento gradual da anemia, entre outras.

A principal vantagem do uso da técnica de PCR, na identificação da espécie de plasmódio é, sem dúvida, a alta sensibilidade da mesma que detecta níveis baixos de parasitémias com frequência não observados pela M.O (Conway., 2007; Snounou *et al.*, 1993). Apesar da técnica de M.O. ser considerada como a técnica mais importante para o diagnóstico rápido da infecção malárica, a técnica de PCR poderá ser aplicada em paralelo, sobretudo nos estudos epidemiológicos em que são necessárias diferentes e detalhadas informações como por exemplo a detecção de infecções mistas (duas ou mais espécies ou dois ou mais genótipos dentro de uma espécie) e de estudos de acompanhamento e da dinâmica de uma infecção. Reconhece-se assim a importância da utilização da técnica de PCR para um diagnóstico mais acurado da malária mas também para outras investigações como os exemplos acima citados, ou dos mecanismos de resistência parasitária (estudos de genética e moleculares), e outros. É importante realçar que o elevado custo dos equipamentos e reagentes utilizados nas técnicas de biologia molecular, como a técnica de PCR, assim como a formação e actualização contínua dos recursos humanos, representam importantes factores limitantes principalmente nos países com poucos recursos, como o caso de Moçambique.

---

## IV.2 - Caracterização das formas clínicas de malária nos pacientes do estudo

Este estudo incluiu apenas crianças até os 15 anos de idade, e considerou-se a existência dos seguintes grupos de classificação: malária não complicada e malária grave e/ou complicada. A sintomatologia primária da malária é causada principalmente pela ruptura dos esquizontes com destruição dos eritrócitos, podendo esta doença apresentar um curso gradual ou fulminante sem que existam sintomas específicos.

Na malária não complicada a apresentação clínica pode assemelhar-se a uma infecção viral comum, o que resulta muitas vezes no diagnóstico tardio desta infecção (Murphy *et al.*, 1996). Estudos realizados demonstraram que na infecção malárica não grave a sintomatologia varia desde febre (> 92% dos casos), calafrios (79%), dor de cabeça (70%) e sudorese (64%). Adicionalmente, outros sintomas comuns podem estar presentes e incluem mal-estar geral, mialgias, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia e tosse seca. As crianças mais pequenas podem ainda apresentar convulsões febris devido à elevação súbita da temperatura corporal (Molyneux., 1989; Newton *et al.*, 1998).

No nosso estudo, a avaliação clínica dos pacientes malária não complicada mostrou a febre como sintoma predominante, o que está de acordo com a literatura (Molyneux., 1989; Trampuz *et al.*, 2003). Após o tratamento antimalárico, exceptuando três pacientes, todos apresentavam-se em boas condições clínicas mesmo naqueles casos (17,2%) em que a M.O demonstrou a presença de parasitas no sangue.

Em relação à malária grave e/ou complicada, esta tem sido reportada como causando cerca de 1 milhão de mortes, anualmente, principalmente em crianças africanas menores de 5 anos, sendo a anemia grave, a malária cerebral e a acidose metabólica consideradas as manifestações clínicas principais (W.H.O., 2000). Os critérios clínicos e laboratoriais que classificam a malária grave, foram definidos pela O.M.S com o objectivo de alertar aos clínicos para os seus sinais e sintomas. No entanto, existem diferenças na frequência das várias manifestações clínicas, em diferentes idades e em diferentes níveis de endemicidade, o que limita a generalização destes critérios (W.H.O., 2000).

No presente estudo, a principal limitação foi a dificuldade de seguimento dos pacientes devido a vários constrangimentos, principalmente a permanência demorada destes na unidade de cuidados intensivos, onde tanto o acesso como as rotinas hospitalares dificultam a realização de investigação clínica. No entanto, apesar dos constrangimentos citados, foi possível fazer uma avaliação clínica de todas as crianças à chegada da unidade sanitária. Neste grupo de pacientes

---

destacou-se a presença de convulsões de repetição associadas a alterações do nível de consciência, em todos pacientes com malária cerebral.

Um outro sinal foi a presença de anemia grave, associada à malária cerebral em 7,3% dos pacientes e, como única complicação em 41,5%. Estes achados estão de acordo com investigações prévias que indicam que, em crianças Africanas de regiões endémicas para a malária, a malária grave manifesta-se, frequentemente, com convulsões, alteração da consciência, acidose metabólica e anemia grave (Molyneux *et al.*, 1989; Marsh *et al.*, 1995; Waller *et al.*, 1995).

Adicionalmente, no grupo de pacientes com malária grave e/ou complicada, foram verificados 3 óbitos antes de 24 horas após o internamento, de entre os casos de malária cerebral. Estes óbitos podem estar relacionados não só à gravidade do quadro clínico apresentado como ao início tardio do tratamento, principalmente devido à demora de procura dos serviços de saúde frequentemente observada na nossa população. Por outro lado, pela evolução do quadro clínico, com instalação e evolução rápida das manifestações clínicas, a morte poderá provavelmente ter ocorrido por complicações clínico-patológicas graves associadas, entre outros factores, a uma variedade das síndromes clínicas.

Uma limitação encontrada que não possibilitou a análise detalhada da(s) causa(s) dos óbitos verificados no nosso estudo foi a dificuldade de realização de autópsias, por não aceitação por parte dos familiares. A existência limitada de investigações *pós-mortem*, em crianças, ou de literatura com descrições clínico-patológicas claras relacionadas às formas graves de malária, impossibilita a associação de síndromes específicos à causa de morte, como por exemplo o sequestro de parasitas na microcirculação cerebral, a hemorragia cerebral, o edema cerebral, a herniação transtentorial, a isquemia cerebral difusa, entre outros, dificultando o entendimento das várias teorias possíveis da patogénese da malária cerebral (Walker *et al.*, 1992; Newton *et al.*, 1998; Warrell *et al.*, 1999).

Um outro aspecto importante de referir, associado à malária grave, relaciona-se com a diminuição da imunidade causada pela infecção pelo vírus de imunodeficiência humana (VIH) no País. Apesar do presente estudo não estar direccionado para a análise da relação entre a infecção pelo VIH e a malária grave, não podemos deixar aqui de mencioná-la, uma vez que a prevalência de infecção pelo VIH em Moçambique é de cerca de 16,2%, com cerca de 140.000 de crianças infectadas abaixo dos 15 anos de idade (<http://www.unaids.org/>). Este facto leva-nos a estabelecer uma relação entre o surgimento de formas graves de malária e a presença de infecção pelo VIH. Algumas investigações suportam esta relação ao demonstrar que a infecção pelo VIH interfere no funcionamento da imunidade celular, importante para a protecção contra a malária, podendo esta ficar severamente comprometida em indivíduos infectados com o VIH com baixa contagem dos linfócitos T-CD4 (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Por outro lado, o facto da infecção pelo VIH se

---

traduzir numa baixa imunidade individual pode modificar as características da infecção com reconhecido aumento da parasitémia (Van geertruyden *et al.*, 2006; Byakika-Kibwika *et al.*, 2007). A infecção pelo VIH parece também influenciar negativamente na resposta ao tratamento com antimaláricos (Parise *et al.*, 1998).

A utilização indiscriminada da cloroquina, uma prática frequentemente adoptada pela população Moçambicana, é referida como causando um efeito imunossupressor ao interferir no reconhecimento antigénico pelos linfócitos T, na activação das células B e na produção de anticorpos, concorrendo negativamente para capacidade dos pacientes responderem adequadamente ao tratamento antimalárico (Colebunders *et al.*, 1990; Malamba *et al.*, 2007).

Uma alternativa para reduzir o agravamento da sintomatologia, nos casos de malária grave, poderia ser a utilização de supositórios baseados em derivados de artemisinina, referido por alguns autores como fazendo parte de um grupo de medidas pré-referência eficazes na abordagem da malária grave (W.H.O., 2006b; Gomes *et al.*, 2008). Contudo, esta formulação ainda não está disponível no actual plano de tratamento antimalárico em Moçambique.

Em relação a anemia grave, verificada em alguns pacientes do nosso estudo, esta pode ter várias origens desde a existência de infecções maláricas de repetição e/ou crónicas, que levam a um decréscimo gradual da hemoglobina, até a condição nutricional dos pacientes. Em Moçambique, a existência de altas prevalências de desnutrição infantil crónica (41%) e anemia (75%), associadas às parasitoses intestinais e à introdução de alimentação mista precocemente (antes dos 6 meses de vida) nas crianças, dificultam a correcção a médio e longo prazo dos casos de anemia, causados pela infecção malárica (IDS., 2003). As características clínicas principais da anemia grave são a dificuldade respiratória e a circulação hiperdinâmica, que concorrem para uma oxigenação inadequada e um compromisso cardíaco. No entanto, a contribuição relativa de cada um dos factores ainda não está esclarecida (English *et al.*, 1996). Embora a desnutrição seja um factor relevante associado à anemia na infecção malárica, alguns estudos apresentam outros factores a ela associados. Um exemplo é o estudo realizado no Gana, onde foi demonstrado que a anemia grave está associada à baixa idade, malnutrição e a elevação do lactato mas não à hiperparasitémia. Por outro lado, investigações realizadas na Tanzânia relacionaram a parasitémia por *P. falciparum* e a malnutrição como causa de anemia grave (Kahigwa *et al.*, 2002), enquanto que no Burkina-Faso a malnutrição foi considerada como a causa mais importante da anemia (Müller *et al.*, 2003). Outras investigações demonstraram que as taxas de mortalidade por anemia, em crianças hospitalizadas, com infecção malárica, podem ser elevadas estando à volta de 4.7% a 14 - 16% (Slutsker, *et al.*; 1994).

---

A principal abordagem para a correcção da anemia grave consiste na transfusão de sangue (normalmente concentrado de glóbulos vermelhos) cujo objectivo é melhorar o quadro clínico do paciente. Contudo, existem algumas limitações para a utilização de rotina deste procedimento, principalmente em regiões (ex: Moçambique) onde existe uma elevada prevalência da infecção por VIH e uma alta proporção de dadores de sangue seropositivos para VIH (Newton *et al.*, 1992). Por essa razão, em Moçambique, a indicação de transfusão de sangue é baseada não só no valor da hemoglobina como também em critérios clínicos relacionados com presença ou não de complicações associadas (ex: descompensação cardíaca, hiperparasitémia, alteração do nível de consciência, entre outros).

A situação sócio-económica dos pacientes do nosso estudo deve ser aqui referida, pois, segundo dados colhidos através do inquérito aqui realizado a maior parte dos pacientes reside em áreas suburbanas da cidade de Maputo, onde as condições de habitação e saneamento básico são precárias e onde existe uma maior exposição ao vector. Este aspecto pode ser reforçado pelo estudo realizado por Carme e colaboradores onde se estabeleceu uma relação directa entre as condições sócio-económicas e habitacionais e a infecção malárica (Carme *et al.*, 1994). Deve ser acrescentado que em um outro estudo, comparando um grupo de crianças com malária grave com um grupo de crianças com formas leves de malária, concluiu-se que os factores sócio-económicos são pouco importantes para o desenvolvimento da malária grave (Koram *et al.*, 1995).

Neste estudo foi possível colher dados clínicos e parasitários de 274 crianças, hospitalizadas ou em ambulatório, em 3 unidades sanitárias da província de Maputo. De referir que durante o período do estudo, provavelmente pela aplicação a nível do País de novas regras do programa LSDI de controlo da malária, houve uma visível redução do número de crianças internadas ou infectadas (dados não apresentados).

#### **IV.3 - Estudo epidemiológico da resistência aos antimaláricos**

A utilização de fármacos antimaláricos representa, actualmente, o método mais utilizado no controlo da malária, em associação à educação sanitária, à melhoria das condições de habitação e à utilização de redes mosquiteiras, impregnadas ou não. No decorrer das últimas décadas, o aparecimento e propagação de parasitas resistentes à maior parte dos antimaláricos disponíveis tornou-se o principal obstáculo a uma eficiente contenção da doença a nível mundial, não impedindo contudo, o uso contínuo de antimaláricos isoladamente ou em combinações. As várias estratégias de controlo da malária têm, portanto, sido fortemente comprometidas pelo aparecimento de resistência parasitária actualmente disseminada por praticamente todas as áreas onde a malária é

---

endémica (Wongsrichanalai *et al.*, 2002; Wernsdorfer & Noedl, 2003). Apesar de não existirem dados actualizados sobre a resistência aos antimaláricos em Moçambique, o primeiro registo de resistência foi identificado na década de 80 com a resistência, *in vivo*, do *P. falciparum* à cloroquina (Schwalbach *et al.*; 1986).

Existem vários métodos para analisar a sensibilidade do *P. falciparum* aos antimaláricos, sendo que os métodos tradicionais baseiam-se sobretudo em testes *in vitro* e/ou *in vivo*. Os testes *in vivo* consistem no tratamento de um grupo de indivíduos sintomáticos e parasitados, com concentrações de fármaco pré-determinadas, seguido de uma monitorização da resposta clínica e/ou parasitológica durante um determinado período. Estes testes possuem a vantagem de ser possível ter em conta as interacções entre o parasita e o hospedeiro, reflectindo por isso situações clínicas e epidemiológicas reais. Contudo, uma série de problemas têm vindo a limitar a sua utilização, nomeadamente a dificuldade do acompanhamento dos doentes (“follow-up”), no mínimo de 7 dias, às dificuldades burocráticas de implementação dos testes no terreno (ex: regras hospitalares), aos problemas na distinção entre recrudescência e re-infecção e ao controlo individual da ingestão de antimaláricos e de outros fármacos não prescritos para o estudo. Não se deve esquecer o uso de plantas medicinais tradicionais que podem ou não afectar a dinâmica de uma infecção, e cujo conhecimento é hoje escasso.

Em relação aos testes *in vitro*, estes baseiam-se na recolha de sangue de um paciente parasitado, onde os parasitas são expostos a quantidades precisas de um determinado composto numa placa de micro-cultura. Tal técnica permite observar o grau de inibição de crescimento e/ou morte parasitária, reflectindo o grau de susceptibilidade dos parasitas a um determinado fármaco e a uma determinada concentração. Os testes *in vitro*, apresentam também algumas limitações de execução, tais como problemas na manutenção de condições de esterilidade, dificuldade no controlo dos níveis de fármaco nas culturas devido à ingestão prévia de antimaláricos por parte do doente, limitação no número de culturas simultâneas, ausência de uma correlação total com a situação *in vivo*, entre outros. No entanto, foram os testes *in vitro* os que deram indicação precoce a resistência *in vivo* em muitas regiões.

Na presente investigação, os estudos de resistência foram dirigidos aos antimaláricos utilizados no País. Deve ser referido que o estudo foi fortemente afectado pela alteração da primeira linha de tratamento por duas vezes, por orientação e directiva do Ministério de Saúde de Moçambique. As amostras analisadas eram provenientes de pacientes observados em 3 unidades sanitárias (dois centros de saúde e um hospital central) da Província de Maputo. O nosso estudo incluiu a análise dos polimorfismos dos genes *pfprt* (associado a resistência à cloroquina), *pfdhfr* e

---

*pfdhps* (associado à resistência à pirimetamina e sulfadoxina), *pfmdr1* (associado a resistência a amodiaquina) e finalmente *pfATPase6* (associado à resposta à artemisinina e seus derivados).

Todos estes medicamentos fizeram ou fazem parte da plano terapêutico nacional de tratamento da malária em Moçambique tendo contudo, a cloroquina e a amodiaquina sido retiradas em 2002-4 do referido plano. Apesar de tudo, deve-se considerar que a retirada destes medicamentos parece não ter influenciado o desaparecimento dos parasitas portadores dos genes de resistência a estes fármacos, um processo moroso e dependente de outros factores.

Verificou-se que tanto no grupo tratado com sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar ®) como no grupo tratado com a combinação de sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar ®) + amodiaquina, a prevalência dos alelos mutados foi sempre elevada, principalmente no gene *pfdhfr*. Para este gene os alelos mutados 51I, 59R e 108N apresentaram predominância absoluta, tanto antes como depois do tratamento, demonstrando claramente a fixação destes nesta população. Na verdade, estas observações estão de acordo com alguns estudos realizados em Moçambique que demonstraram a existência de altas frequências de mutações à sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®) (Abacassamo *et al.*, 2004). Um estudo recentemente publicado (Raman *et al.*, 2008) realizado no sul de Moçambique, no âmbito da Iniciativa Espacial dos Libombos (LSDI), mostrou a existência de altas prevalências de mutações nos genes *pfdhfr* e *pfdhps* no período compreendido entre 1999 e 2004, com um pico de resistência à sulfadoxina/pirimetamina (S/P) em 2001, que coincidiu com a resistência a este antimalárico nas regiões vizinhas do sul de Moçambique. O mesmo estudo mostrou ainda uma redução da frequência de mutações no gene *pfdhps*, mas não no gene *pfdhfr*, no período após a substituição da S/P pelo Coartem (artesunato/lumefantrina) (Raman *et al.*, 2008).

No nosso estudo, na análise da mutação *pfdhfr*108N, descrita por alguns autores (Peterson *et al.*, 1991; Biswas *et al.*, 2000; Sibley *et al.*, 2001) como a mutação precursora para o surgimento de todas as estirpes resistentes à pirimetamina, verificou-se uma elevada frequência de amostras contendo o alelo mutado 108N antes do tratamento o que indica a existência desta mutação em circulação na população do estudo. Estudos realizados indicam que a presença da mutação 108N associada às mutações 51I e 59R, designado de triplo mutante, está associada ao aumento progressivo dos níveis de resistência farmacológica à S/P (Plowe *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 1991).

Ainda no gene *pfdhfr*, para o codão 164, verificou-se a ausência do alelo mutante 164L, assim como de mistura de alelos (164L+164I) em todas amostras analisadas, o que está de acordo com investigações realizadas em África em relação a este polimorfismo (Nzila *et al.*, 2005). Para o gene *pfdhps*, apesar da presença das mutações ser menos frequentes, as mesmas estão já estabelecidas na população parasitária.

---

Tanto no grupo tratado com sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®), como no grupo tratado com sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar ®) + amodiaquina, a elevação do número de amostras contendo o alelo mutado *pf dhps* 437G, depois do tratamento, revelou-se estatisticamente significativa indicando a possível utilidade deste polimorfismo como marcador molecular de resistência de resistência à S/P na região estudada. No entanto, alguns autores tem considerado de menor relevância as associações entre mutações nos genes *pf dhfr* e *pf dhps* com a resposta clínica e/ou parasitológica (Jelinek *et al.*, 1998; Omar *et al.*, 2001).

Por outro lado, tem sido demonstrado que a associação de um marcador molecular parasitário com a resposta terapêutica *in vivo* depende também de outros factores como por exemplo a imunidade do hospedeiro (pode mascarar a parasitemia), a genética do hospedeiro (metabolização diferente dos antimaláricos pelos diferentes hospedeiros humanos) e a base genética da resistência (mutações simples e mutigénicas) (Sibley *et al.*, 2001; Kyabayinze *et al.*, 2003).

No que diz respeito à identificação de amostras com mutações múltiplas (com mais de uma mutação nos genes em estudo) investigações realizadas no continente Africano (Bwijo *et al.*, 2003; Mugittu *et al.*, 2004; Happi *et al.*, 2005; Nsimba *et al.*, 2005) confirmam que uma população homogênea com a presença do triplo mutante *pf dhfr* 51I, 59R e 108N) em simultâneo, no gene, está associada à falência terapêutica ao 7º dia com tratamento com S/P, sendo esta associação reforçada pela presença adicional de *pf dhps* 437G e 540E designada no seu conjunto de “quintuplo mutante”.

No nosso estudo verificou-se um aumento significativo da frequência de amostras com o quintuplo mutante (*pf dhfr*+*pf dhps*), após o tratamento com S/P. O mesmo não se verificou com o grupo de amostras tratadas com a associação S/P+amodiaquina”, onde houve um decréscimo significativo do triplo mutante (*pf dhfr*) e uma redução da frequência de isolados com o quintuplo mutante (*pf dhfr*+*pf dhps*), depois do tratamento. Verificou-se também uma diminuição significativa de isolados com o quintuplo mutante (*pf dhfr*+*pf dhps*), associado ao alelo mutante *pf mdr1* (86Y). Neste contexto, deve ser dada especial atenção às observações aqui encontradas, uma vez que o estudo realizado por Alifrangis e colaboradores, em Moçambique, demonstrou que a existência de duas mutações nomeadamente, *pf dhfr* 59R e *pf dhps* 437G, são suficientes para predizer falências parasitológicas significativas ao tratamento com S/P (Alifrangis *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por Kublin e colaboradores, (Kublin *et al.*, 2002) com crianças no Malawi, encontrou uma forte associação entre a presença do quintuplo mutante e a falência terapêutica à S/P. O mesmo estudo permitiu também verificar que estando presentes as mutações *pf dhfr* 59R e *pf dhps* 540E, estas permitiam prever a existência do quintuplo mutante. Estas observações foram posteriormente corroboradas por outros autores (Bwijo *et al.*, 2003; Talisuna *et al.*, 2004; Mbugi *et al.*, 2006).



---

No entanto, apesar da existência de estudos que reportam a associação entre a resposta ao tratamento à S/P e os polimorfismos genéticos, o envolvimento de certas mutações na mediação de outras resistências continua não esclarecido. Os estudos da propagação ou alastramento de clones ou parasitas resistentes a antimaláricos são complexos e de difícil avaliação, tanto que essa propagação depende também da capacidade dos parasitas, para além de sobreviverem ao tratamento, terem a capacidade de se transmitirem através do mosquito vector a outros pacientes, competindo com vantagem contra outros plasmódios, da mesma espécie. Esta característica, geralmente denominada “fitness” tem sido associada aos plasmódios resistentes aos diversos fármacos utilizados, não existindo ainda prova de resistência, no momento, a artemisinina e seus derivados. A utilização de marcadores moleculares identificadores ou preditores da resistência a um tratamento, apenas parece ser aceitável para estudos clínicos no caso da S/P dado que os restantes marcadores conhecidos, apesar de associados à resistência *in vivo*, não são característicos. Adicionalmente, tendo em conta o facto da maioria dos estudos existentes em África terem sido realizados sobretudo na África Oriental, onde a resistência à S/P foi aparentemente motivada pela rápida expansão de um clone altamente resistente, torna-se difícil determinar a importância do envolvimento de mutações isoladas na mediação da resistência a este fármaco (Roper *et al.*, 2003). Particularmente, na África Oriental a mutação *pfdhfr* 51I está frequentemente associada à *pfdhfr* 59R e para o gene *pfdhps* a 437G está fortemente associada à 540E (Kyabayinze *et al.*, 2003). Contrariamente, num outro país da região da África Oriental, a associação entre as mutações *pfdhfr* 51I e 59R é mais fraca sendo a mutação *pfdhps* 437G comum não obstante a ausência do genótipo 540E (Marks *et al.*, 2005). Estes dados indicam que o surgimento de mutações e a sua manutenção numa dada região dependerá de outros factores.

Assim, e embora tratando-se de uma das primeiras investigações deste tipo em Moçambique, os resultados aqui obtidos, relacionados à resistência a S/P, suscitam preocupações sobre o uso deste fármaco como uma componente de primeira linha tratamento antimalárico em Moçambique, pela já elevada prevalência de estirpes consideradas altamente resistentes, tal como observado em diferentes países de África (Plowe *et al.* 1997; Nzila *et al.* 2000). A continuação do uso da S/P poderá aumentar a pressão selectiva deste fármaco causando um aumento progressivo da proporção de mutantes resistentes a este antimalárico. Deve ser acentuado que a combinação S/P é amplamente utilizada, com relativo sucesso, como profilático da malária na mulher grávida, em Moçambique (Brentlinger *et al.*, 2007).

Adicionalmente, os resultados obtidos poderão contribuir para a continuidade das investigações nesta área, complementado com a realização de testes *in vitro*, para ser possível

---

efectuar comparações entre os resultados obtidos pelos diferentes métodos, de modo a estabelecer os valores preditivos de resistência relativos um determinado marcador molecular.

Relativamente ao gene *pfmdr1* a presença do polimorfismo N86Y e/ou 1246Y tem vindo a ser associado à menor susceptibilidade de *P. falciparum* à amodiaquina em África (Khalil *et al.*, 2005; Dokomajilar *et al.*, 2006). No nosso estudo, a análise do gene *pfmdr1* foi realizada devido a utilização da combinação terapêutica S/P + amodiaquina, no grupo de pacientes com malária não complicada. A prevalência observada para o alelo 86Y do gene *pfmdr1*, antes do tratamento, era de 78,2% tendo-se mantido em 82,3% após o tratamento. Da mesma forma identificaram-se cerca de 22,8% de isolados com o alelo 1246Y antes do tratamento e 22,3% após o mesmo. A prevalência acima indicada está de acordo com outros estudos que indicam a presença do alelo mutante (86Y) no gene *pfmdr1* como um factor preditivo da falência ao tratamento com monoterapia com amodiaquina (Nsobya *et al.*, 2007).

Relativamente aos polimorfismos no gene *pfcr1* 75 e 76, descritos como estando relacionados à resistência *in vivo* e *in vitro* à cloroquina, os resultados obtidos no nosso estudo indicaram prevalências elevadas para os alelos mutados 76T e 75E, achados esses consistentes com estudos realizados por outros autores em África (Mayor *et al.*, 2001; Warhurst, 2003) e na Ásia (Lim *et al.*, 2003). Curiosamente, as prevalências deste dois alelos verificadas no nosso estudo conduzem-nos a observações intrigantes uma vez o uso da cloroquina, para o tratamento dos casos de malária, foi oficialmente abandonado em 2002. Assim, poder-se-ia esperar que as frequências dos alelos mutados na população parasitária fossem mais reduzidas devido a interrupção da pressão selectiva exercida pelo fármaco. De facto, a tendência para uma redução do mutante 76T, na ausência da utilização da cloroquina foi verificada num estudo realizado no Malawi onde a sua frequência diminuiu de 85% para 13%, oito anos após a utilização deste composto, para tratamento e profilaxia, ter sido abandonada no País (Kublin *et al.*, 2003). No nosso estudo, uma hipótese para justificar as elevadas prevalências dos alelos mutados no gene *pfcr1*, na região estudada, pode ser a utilização indiscriminada deste fármaco que, apesar de ter sido oficialmente retirado da circulação, pode ainda ser adquirido no mercado paralelo.

Em relação ao gene *pfATPase6*, relacionado com a resistência a artemisinina, existe pouca informação publicada relacionada à variação alélica neste gene. No nosso estudo, apesar das limitações técnicas e de amostragem, foram analisados os codões 110, 769, 1916 e 2694, deste gene, tendo-se observado apenas para o codão 2694, tanto antes como após o tratamento, mutações que não causam alteração do aminoácido. No entanto, existe pouca informação relativa aos possíveis genótipos existentes do gene *pfATPase6* o que limita a interpretação de resultados obtidos. Num estudo prévio realizado em parasitas provenientes do continente Africano e Americano, mais

---

especificamente do Senegal e da Guiana Francesa, foram encontrados 23 polimorfismos sinónimos e não-sinónimos, tendo sido identificados 8 tipos de proteína PfATPase6 (Jambou *et al.*, 2005).

Nesse estudo, que incluiu também parasitas provenientes do Camboja, todas as mutações encontradas foram sinónimas, indicando uma maior conservação do gene e consequentemente da proteína, por parte dos parasitas Asiáticos (Jambou *et al.*, 2005). Em concordância, outro estudo realizado com amostras da Tailândia, somente encontrou um polimorfismo não-sinónimo entre as sequências (Price *et al.*, 2004).

Ainda em relação a análise do gene *pfATPase6*, estudos realizados indicam que parasitas africanos parecem ser mais sensíveis aos derivados da artemisinina estando reportadas médias geométricas IC50s, para o artesunato, de 0,58, 0,73, e 2.2nM de São Tomé, Gabão e Senegal, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2007; Ramharther *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 2006). Contrariamente, o estudo de Jambou e colaboradores descreveu vários isolados frescos, de *P. falciparum*, da Guiana Francesa, com níveis IC50 para a artimisinina acima de 40nM, o que indica uma tendência significativa à baixa tolerância a este fármaco (Jambou *et al.*, 2005). Em Moçambique a artemisinina e seus derivados têm sido utilizados, com sucesso, em combinação com outros antimaláricos para o tratamento da malária não complicada. Um estudo realizado em crianças com malária não complicada, em Moçambique, onde se analisou a eficácia da cloroquina, amodiaquina, S/P e das combinações terapêuticas deste fármacos com artesunato, mostrou que a terapia combinada tinha um efeito mais rápido na redução da febre e da gametocitémia (Abacassamo *et al.*, 2004)

No presente estudo foram identificadas infecções policlonais em todas marcas genéticas analisadas, as quais estão representadas por infecções mistas. Este achado pode ser suportado por várias publicações relacionadas com a diversidade genética em populações selvagens de *P. falciparum* (Conway., 2007; Walliker, 1994) que referem ser frequente encontrar na natureza infecções policlonais, isto é, a presença de mais de um tipo de plasmódio da mesma espécie, em crescimento simultâneo, numa mesma amostra de sangue infectado (Rosário.,1981). Esta diversidade genética das populações parasitárias varia consoante a área geográfica (Creasey *et al.*, 1990). Por outro lado, quanto maior for a densidade vectorial e o contacto dos vectores com humanos infectados, numa determinada região, maior será a probabilidade de surgirem parasitas com múltiplas recombinações (Farnet *et al.*, 2002; Walliker., 1994).

Em resumo, realizou-se a análise de uma população natural do parasita *P. falciparum* em Maputo, Moçambique, tendo sido avaliado o perfil genotípico, num momento em que a artemisinina e derivados estão a ser utilizados como antimaláricos de primeira e segunda linha para o tratamento

---

da malária não grave no País. Assim, mesmo sendo limitadas as informações aqui apresentadas, estas podem ser utilizadas como base para investigações futuras nesta área.

#### **IV.4 - Estudo de factores genéticos humanos relacionados com a susceptibilidade/resistência à malária**

A mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> tem sido encontrada em várias populações em África e na América do Norte, tendo nesta sido identificada principalmente em populações Afro-Americanas (41%); caucasianas (1%), asiáticas (10%) e hispánicas (4%) (Zimmerman *et al.*, 1997). Em África, investigações realizadas no Quênia encontraram uma frequência da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> superior a 30%, tendo esta sido indicada como marcador de susceptibilidade para a malária cerebral (Fernandez-Reyes *et al.*, 1997). Estes achados revelaram-se contraditórios, com um outro estudo realizado na Gâmbia em que não foi demonstrada a existência de correlação entre o polimorfismo no gene *ICAM-1* e a gravidade da infecção malárica (Bellamy *et al.*, 1998).

A existência de uma discrepância na distribuição da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup>, no mundo, foi comprovada num estudo realizado por Fernandez-Reyes e colaboradores onde esta mutação esteve ausente em populações caucasianas (da Europa) e asiáticas (da Tailândia), enquanto que no grupo populacional da Papua Nova Guiné a mutação foi identificada. Um outro estudo (Zimmerman *et al.*, 1997) identificou a mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> em Norte -Americanos com ascendente asiático.

Na presente investigação, a presença da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> foi encontrada em 50% em pacientes com malária não-complicada, 44,8% dos pacientes com malária grave e/ou complicada e em 28,5% no grupo controlo (sem malária). Apesar do baixo número de amostras analisadas, para cada um dos grupos aqui estudados, parece haver uma associação entre a presença da mutação no gene ICAM-1<sup>Kilifi</sup> e a infecção malárica nas suas formas não-complicada e grave e/ou complicada. Por outro lado, segundo os nossos resultados parece haver uma correlação significativa entre a ausência de malária e a ausência do alelo mutado. No entanto, deve-se ter em conta a existência de outros factores associados como por exemplo a presença simultânea de mutações, em outros genes e citocinas, que podem estar a interferir na modulação da expressão do gene *ICAM-1*. A título de exemplo, num estudo realizado na Gâmbia, a presença em simultâneo da mutação ICAM-1<sup>Kilifi</sup> e de uma mutação na região promotora de TNF2, foi identificada como estando associada, numa baixa frequência, à severidade da infecção malárica (McGuire *et al.*, 1994). Outras investigações indicaram que os efeitos da mutação no gene *ICAM-1* podem ser influenciados por outros factores geneticamente determinados que aumentam ou diminuem a ligação do alelo mutado ICAM-1<sup>Kilifi</sup> às células infectadas, causando susceptibilidade ou protecção à infecção malárica (Kun *et al.*, 1999).

---

Para o gene *CD36*, por este estar envolvido no processo de sequestração pode contribuir para a resposta do hospedeiro à infecção, razão pela qual foi aqui analisado. Ao contrário do que acontece com outros receptores, a expressão do *CD36* é reduzida no epitélio cerebral. A hipótese de que o *CD36* contribuía para a gravidade da malária foi inicialmente colocada por alguns investigadores, por este mediar uma ligação permanente aos eritrócitos parasitados, o que conduziu ao desenvolvimento de terapêuticas para inibir ou reverter esta interacção (Cooke *et al*, 1998). No entanto, embora a adesão ao *CD36* tenha diminuído com estas terapêuticas verificou-se um aumento significativo da ligação a outros receptores, como o ICAM-1 e o VCAM-1, o que pode contribuir para os efeitos adversos da malária (Yipp *et al*, 2003). Esta observação pode explicar resultados de estudos *in vivo*, que mostraram que parasitas isolados de doentes com malária não grave ligam-se preferencialmente ao *CD36*, em detrimento de outros receptores (Rogerson *et al*, 1999; Traore *et al*, 2000).

Apesar de não estar ainda definido o modo como o *CD36* contribui para a severidade da malária, sabe-se que está associado a alterações no fenómeno de citoaderência e nos mecanismos de defesa ao parasita. É razoável especular-se que a sequestração dos eritrócitos infectados em órgãos não vitais, como a pele ou os músculos, mantém o parasita afastado do cérebro, evitando que ocorra a oclusão dos capilares cerebrais (Serghide *et al*, 2003).

Na nossa investigação procurou-se contribuir para a interpretação da diversidade do gene *CD36* em populações com diferentes formas clínicas de malária. Em particular, procedeu-se à análise da distribuição populacional da mutação T1264G, que introduz um codão de terminação, abolindo a expressão da proteína (Aitman *et al*, 2000). A presença do alelo selvagem foi predominante, com prevalências elevadas, tanto para os grupos com as formas clínicas de malária não-complicada e malária grave com complicações, como para o grupo controlo. Não foram identificadas mutações mistas. Pode-se especular que a mutação T1264G aumenta a vulnerabilidade à malária dado que só está presente nas amostras dos doentes. Um estudo realizado em crianças africanas demonstrou que a forma heterozigótica para esta mutação estava associada à protecção contra as formas severas da infecção (Pain *et al.*, 2001)

Apesar de não ser possível tirar conclusões definitivas com base nas análises aqui apresentadas para os dois genes, parece-nos evidente que a susceptibilidade às doenças infecciosas é marcadamente poligénica. A existência de múltiplos genes afectando a susceptibilidade às doenças infecciosas, reflecte provavelmente o papel importante que os microrganismos patogénicos tiveram na geração de diversidade do genoma humano através da selecção natural. Os genes que têm um papel importante na defesa contra microrganismos patogénicos parecem evoluir a uma taxa superior a qualquer outro classe de genes humanos. Perante este cenário, uma pergunta não pode deixar aqui

---

feita: quais são os mecanismos que mantêm a acentuada diversidade genética observada entre diferentes populações? São ainda desconhecidos, mas um dos mais importantes poderá ser a variação do genoma dos próprios agentes infecciosos que ocorre de forma acentuada, por exemplo, no vírus VIH e no *Plasmodium spp.* As vantagens da heterozigotia de alguns alelos na resistência a algumas doenças infecciosas, podem também ter contribuído para a diversidade genómica humana. Outros factores importantes mas aleatórios e difíceis de quantificar são os factores ambientais. Assim, a susceptibilidade individual para uma doença infecciosa será o resultado de uma grande variedade de factores genéticos tanto da parte do hospedeiro como do agente infeccioso, com uma contribuição relativamente importante de factores ambientais. Esta perspectiva evolucionária extremamente dinâmica sugere que os genes que afectam a susceptibilidade a uma doença infecciosa podem apresentar uma heterogeneidade inter-populacional significativa devido a variações geográficas do genoma do agente patogénico e variações na frequência dos genes humanos intervenientes, e ainda a variações ambientais locais.

Apesar das limitações, o nosso estudo foi o primeiro a ser realizado com amostras provenientes de Moçambique, para a análise dos marcadores humanos de susceptibilidade à infecção malárica. Tratam-se, pois, de análises preliminares, ainda pouco consistentes, que requerem investigações futuras mais acuradas.

#### **IV.5 - Estudo de factores genéticos humanos associados ao metabolismo de fármacos antimaláricos**

O fracasso terapêutico e a resistência aos antimaláricos converteram-se num problema importante que impede o controlo adequado da malária em vários países onde a malária é endémica. Contudo, até ao momento não são conhecidos estudos onde tenham sido aprofundados os factores do hospedeiro que influenciam a resposta terapêutica, centrando-se a maioria das investigações na resistência do *Plasmodium* aos antimaláricos, em particular por *P. falciparum*. Um dos elementos que determinam a resposta terapêutica antimalárica é o percurso metabólico da biotransformação do medicamento antimalárico no organismo humano, que pode gerar compostos mais activos que o fármaco original, ou outros, com pouca ou nenhuma actividade ou de excreção mais rápida.

A maior parte da biotransformação dos medicamentos ocorre no fígado com a participação do complexo enzimático do citocromo P-450 (CYP-450). Várias enzimas deste complexo participam na biotransformação dos diferentes medicamentos antimaláricos no organismo humano incluindo a amodiaquina, onde a principal via de eliminação é a transformação desta em desetilamodiaquina, pela acção da CYP2C8 no fígado (Gião *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). Na

---

presente investigação analisaram-se os polimorfismos na variante CYP2C8 para os quais o resultado revelou-se inconclusivo, tendo-se observado predominância do alelo selvagem, quer na forma homozigótica ou heterozigótica. Não foi possível extrapolar esta observação para a resposta terapêutica ao tratamento uma vez que foram apenas analisadas amostras de pacientes colhidas antes do tratamento.

A relação directa entre os CYP-450 e a resposta terapêutica antimalárica é complexa uma vez que os polimorfismos genéticos nos CYP-450 são influenciados por diversos factores biológicos e sociais como por exemplo a dieta, a presença de outras doenças, o uso de medicamentos e suas interações, entre outros, que contribuem para a grande variabilidade que se observa no metabolismo dos antimaláricos (Mihaly *et al.*, 1987; Walter-Sack *et al.*, 1996; Morgan., 2001). A terapia combinada com antimaláricos pode também influenciar o sistema enzimático dos CYP-450. Combinações baseadas na associação da amodiaquina com a mefloquina influenciam pouco o sistema enzimático CYP-450, ao contrário do observado no tratamento combinado com S/P. Este facto pode explicar-se uma vez que a mefloquina e a amodiaquina metabolizam-se por vias diferentes da S/P (Gião *et al.*, 2001). A resposta terapêutica aos medicamentos antimaláricos é um processo multifactorial e pouco compreendido dificultando por isso a associação a um fenótipo ou genótipo particular, do sistema enzimático do CYP-450, um papel determinado na resposta terapêutica antimalárica. Espera-se que novas investigações permitam responder às várias interrogações sobre a falência terapêutica ao tratamento com antimaláricos, incluindo o percurso metabólico dos antimaláricos.

Para finalizar, considero que estudos que incluam genotipagem de marcadores parasitários de resistência e de farmacogenética tenham mais utilidade na avaliação da aplicação de novos fármacos em aplicação em Moçambique [ex:artesunato/lumefantrina (Coartem<sup>TM</sup>)] para os quais não existe ainda referência de resistência parasitária, sendo fundamental identificar se qualquer falha clínica à terapêutica efectuada poderá estar associada a qualquer daqueles dois parâmetros ou factores.

---

## **V. PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO**



---

Considerando a problemática da resistência aos antimaláricos em Moçambique principalmente relacionada à sulfadoxina/pirimetamina, que continua a fazer parte da primeira linha de tratamento da malária no País, consideramos que seria importante esclarecer de forma mais detalhada os mecanismos de resistência que lhe estão associados, sobretudo na situação de multiplicidade de mutações no (s) mesmo(s) gene(s) e sobre o papel destas na “fitness” dos parasitas resistentes e a sua capacidade de transmissão. Assim, e tendo por base algumas hipóteses levantadas com os resultados obtidos neste estudo, consideramos importante a continuidade da análise dos polimorfismos aqui estudados assim como de outros polimorfismos relacionados com os genes *pfdhps* e *pfdhps*.

É fundamental estudar a resposta terapêutica *in vivo* à outros antimaláricos utilizados no País, nomeadamente a lumefantrina/artemisinina (Coartem™) e a amodiaquina. A abordagem metodológica para os estudos acima citados deverá ser complementada com estudos *in vitro* e, dentro do possível, fazendo um seguimento mais prolongado dos pacientes, nomeadamente ao 14º e 28º dia. Tal significa que deverá haver uma maior integração de trabalho com as comissões de ética do País, e com os clínicos em actividade na área da malária para melhor se fazer entender a importância da investigação no laboratório em apoio ao trabalho hospitalar.

Relativamente ao estudo dos marcadores moleculares de susceptibilidade à malária, esta parece ser uma linha de trabalho com interesse embora se saiba da dificuldade em se poder rapidamente fazer esta associação, sobretudo em *P. falciparum*. Implica a óbvia dificuldade na selecção da amostragem dada a existência de programas diversos e bem sucedidos de controlo da malária no Sul do País. Em estudos futuros, poderiam ser envolvidos mais marcadores (ex: G6PD, NOS2, VCAM-1) cujo papel no envolvimento na infecção malárica continua por esclarecer. Particularmente, seria interessante efectuar um estudo não só do envolvimento da G6PD na malária como também da caracterização da deficiência desta enzima na população Moçambicana. Este estudo estaria justificado uma vez que as duas variantes da deficiência desta enzima encontram-se na África sub-Sahariana e porque teria um impacto clínico directo no diagnóstico para a prevenção pré-natal.

Do nosso trabalho de investigação consideramos que a área da farmacogenética deve estar associada ao estudo da resistência aos antimaláricos, mas de uma forma específica, com uma amostragem maior e bem definida em termos de populações e regiões. Os países Africanos possuem enorme miscigenação de raças nas zonas urbanas e periurbanas mas no interior ainda se encontram regiões com populações relativamente estáveis e sem integração de outras raças ou “tribos”. Clarificar os mecanismos relacionados com os factores genéticos humanos associados ao metabolismo de fármacos antimaláricos, na falência terapêutica, envolvendo outros antimaláricos

---

para além dos utilizados neste estudo poderá trazer informação relevante. Este estudo poderia ser efectuado, em simultâneo, com a análise dos marcadores moleculares de resistência aos antimaláricos.

Finalmente, para um clínico e pediatra em Moçambique, há a enorme necessidade de se fazer trabalho em outras áreas para além da malária, e se possível, na interacção desta doença com outras de elevada prevalência como o por exemplo o VIH/SIDA.

---

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

**Abacassamo**, F., Enosse, S., Aponte, J.J., Gomez-Olive, F.X., Quinto, L., Mabunda, S., Barreto, A., Magnussen, P., Ronn, A.M., Thompson, R., Alonso, P.L. (2004). Efficacy of chloroquine, amodiaquine, sulphadoxine-pyrimethamine and combination therapy with artesunate in Mozambican children with non-complicated malaria. *Tropical Medicine and International Health*. **9**(2):200-8.

**Adagu**, I.S., Warhurst, D.C. (2001). *Plasmodium falciparum*: linkage disequilibrium between loci in chromosomes 7 and 5 and chloroquine selective pressure in Northern Nigeria. *Parasitology*. Sep; **123** (Pt 3): 219-24.

**Adjuik**, M., Agnamey, P., Babiker, A., Borrmann, S., Brasseur, P., Cisse, M., Cobelens, F., Diallo, S., Faucher, J.F., Garner, P., Gikunda, S., Kremsner, P.G., Krishna, S., Lell, B., Loolpapit, M., Matsiegui, P.B., Missinou, M.A., Mwanza, J., Ntoumi, F., Olliaro, P., Osimbo, P., Rezbach, P., Some, E., Taylor, W.R. (2002). Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet*. Apr 20;**359**(9315):1365-72.

**Adonis-Koffy**, L., Daubrey, T., Kouadio, A., Timite-Konan, A.M., Kabran, J. (2003). Misunderstood neurological side effects of amodiaquine: apropos of 35 cases in children at Central University Hospital of Yopougon at Abidjan, Cote d' Ivoire. *Bulletin de la Societe de Phatologie Exotique*. Nov; **96** (4): 306-7.

**Afonso**, A., Hunt, P., Cheesman, S., Alves, A.C., Cunha, C.V., do Rosario, V., Cravo, P. (2006). Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes atp6 (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase), tctp, mdr1, and cg10. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Feb; **50** (2): 480-489.

**Akpede**, G.O., Sykes, R.M., Abiodun, P.O. (1993).Convulsions with malaria: febrile or indicative of cerebral involvement? *Jounal Tropical of Pediatrics*. Dec;**39**(6):350-5.

**Alker**, A.P., Mwapasa, V., Purfield, A., Rogerson, S.J., Molyneux, M.E., Kamwendo, D.D., Tadesse, E., Chaluluka, E., Meshnick, S.R. (2005). Mutations associated with sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Blantyre, Malawi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Sep;**49**(9):3919-21.

**Aitman**, J.T., Cooper, L.D., Norsworthy, P.J., Wahid, F.N., Gray, J.K., Curtis, B.R., McKeigue, P., Kwiatkowski, D., Greenwood, B.M., Snow, R.W., Hill, A.V., Scott, J. (2000) Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* **405**: 1015-1016.

**Alifrangis**, M., Enosse, S., Khalil, I.F., Tarimo, D.S., Lemnge, M.M., Thompson, R., Bygbjerg, I.C., Ronn, A.M. (2003). Prediction of *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine/pyrimethamine in vivo by mutations in the

---

dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes: a comparative study between sites of differing endemicity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **69**(6):601-6.

**Artavanis-Tsakonas, K.**, Tongren, J.E., Riley, E.M. (2003).The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical & Experimental Immunology*. Aug;**133**(2):145-52.

**Aubouy, A.**, Bakary, M., Keundjian, A., Mbomat, B., Makita, J.R., Migot-Nabias, F., Cot, M., Le Bras, J., Deloron, P. (2003). Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxinepyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Jan; **47**(1): 231-7.

**Ballereau, F.**, Prazuck, T., Schrive, I., Lafleurriel, M.T., Rozec, D., Fisch, A., Lafaix, C. (1997).Stability of essential drugs in the field: results of a study conducted over a two-year period in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul; **57**(1): 31-6.

**Barennes, H.**, Nagot, N., Valea, I., Koussoube-Balima, T., Ouedraogo, A., Sanou, T., Ye, S. (2004). A randomized trial of amodiaquine and artesunate alone and in combination for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in children from Burkina Faso. *Tropical Medicine and International Health*. Apr; **9**(4): 438-44.

**Basco, L.K.** (1991). Inefficacy of amodiaquine against chloroquine-resistant malaria. *Lancet*. Dec 7; **338** (8780): 1460.

**Basco, L.K.**, Ringwald, P. (2002). Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. Evaluation of PFMDR1 mutations as genetic markers for resistance to amino alcohols and artemisinin derivatives. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jun; **66** (6): 667-71.

**Bellamy, R.**, Kwiatkowski, D., Hill, A.V. (1998).Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. May-Jun;**92**(3):312-6.

**Bennett, T.N.**, Patel, J., Ferdig, M.T., Roepe, P.D. (2007). *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity and quinine resistance. *Molecular and biochemical parasitology*. May.**153**(1):48-58.

**Biswas, S.**, Escalante, A., Chaiyaroj, S., Angkasekwinai, P., Lal, A.A.(2000). Prevalence of point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from India and Thailand: a molecular epidemiologic study. *Tropical Medicine and International Health*. **5**:737-43.

**Björkman, A.** (2002). Malaria associated anaemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. *International Journal for Parasitology*. **32**:1637–1643.

- 
- Bloand, P.B.** (2003). A contrarian view of malaria therapy policy in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Feb; **68** (2): 125-6.
- Brentlinger, P.E., Dgedge, M., Correia, M.A., Rojas, A.J., Saúte, F., Gimbel-Sherr, K.H., Stubbs, B.A., Mercer, M.A., Gloyd, S.** (2007). Intermittent preventive treatment of malaria during pregnancy in central Mozambique. *Bulletin of the World Health Organization*. Nov; **85**(11):873-9
- Brooks, D.R., Wang, P., Read, M., Watkins, W.M., Sims, P.F., Hyde, J.E.** (1994). Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *European Journal of Biochemistry*. Sep 1; **224** (2): 397-405.
- Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K.P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L. & Lewis, C.E.** (2003). Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *American Journal of Pathology*. **163**: 1233-43.
- Bwijo, B., Kaneko, A., Takechi, M., Zungu, I.L., Moriyama, Y., Lum, J.K., Tsukahara, T., Mita, T., Takahashi, N., Bergqvist, Y., Bjorkman, A., Kobayakawa, T.** (2003). High prevalence of quintuple mutant *dhps/dhfr* genes in *Plasmodium falciparum* infections seven years after introduction of sulfadoxine and pyrimethamine as first line treatment in Malawi. *Acta Tropica*. Mar; **85** (3): 363-73.
- Byakika-Kibwika, P., Ddumba, E., Kanya, M.** (2007). Effect of HIV-1 infection on malaria treatment outcome in Ugandan patients. *African Health Sciences*. Jun; **7**(2):86-92.
- Carlton, J.M., Fidock, D.A., Djimde, A., Plowe, C.V., Wellems, T.E.** (2001). Conservation of a novel vacuolar transporter in *Plasmodium* species and its central role in chloroquine resistance of *P. falciparum*. *Current Opinion Microbiology*. Aug; **4** (4): 415-20.
- Carne, B., Plassart, H., Senga, P., Nzingoula, S.** (1994). Cerebral malaria in African children: socioeconomic risk factors in Brazzaville, Congo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1994 Feb; **50**(2):131-6.
- Cavaco, I., Strömberg-Nörklit, J., Kaneko, A., Msellem, M.I., Dahoma, M., Ribeiro, V.L., Bjorkman, A., Gil, J.P.** (2005). CYP2C8 polymorphism frequencies among malaria patients in Zanzibar. *European Journal of Clinical Pharmacology*. Mar; **61**(1):15-8.
- Chandramohan, D., Owusu-Agyei, S., Carneiro, I., Awine, T., Amponsa-Achiano, K., Mensah, N., Jaffar, S., Baiden, R., Hodgson, A., Binka, F., Greenwood, B.** (2005). Cluster randomised trial of intermittent preventive treatment for malaria in infants in area of high, seasonal transmission in Ghana. *British Medical Journal*. Oct 1; **331**(7519):727-33.

---

**Chawira, A.N., Warhurst, D.C. (1987).** The effect of artemisinin combined with standard antimalarials against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Feb; **90**(1):1-8.

**Checchi, F., Piola, P., Kosack, C., Ardizzoni, E., Klarkowski, D., Kwezi, E., Priotto, G., Balkan, S., Bakyaite, N., Brockman, A., Guthmann, J.P. (2004).** Antimalarial efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine and a combination of chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine in Bundi Bugyo, western Uganda. *Tropical Medicine and International Health*. Apr; **9**(4): 445-50.

**Chimpeni, P., Taylor, T.E., Plowe, C.V. (2002).** Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*. Feb 1; **185** (3): 380-8.

**Cissé, B., Sokhna, C., Boulanger, D., Milet, J., Bâ, el H., Richardson, K., Hallett, R., Sutherland, C., Simondon, K., Simondon, F., Alexander, N., Gaye, O., Targett, G., Lines, J., Greenwood, B., Trape, J.F. (2006).** Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet*. Feb 25; **367**(9511):659-67.

**Cochrane, A.H., Barnwell, J.W., Collins, W.E., Nussenzweig, R.S. (1985).** Monoclonal antibodies produced against sporozoites of the human parasite *Plasmodium malariae* abolish infectivity of sporozoites of the simian parasite *Plasmodium brasilianum*. *Infection and Immunity*. Oct; **50**(1):58-61.

**Cojean, S., Noel, A., Garnier, D., Hubert, V., Le Bras, J. & Durand, R. (2006).** Lack of association between putative transporter gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* and chloroquine resistance in imported malaria isolates from Africa. *Malar Journal*. **5**:24.

**Colebunders, R., Bahwe, Y., Nekwei, W., Ryder, R., Perriens, J., Nsimba, K., Turner, A., Francis, H., Lebughe, I., Van der Stuyft, P. (1990).** Incidence of malaria and efficacy of oral quinine in patients recently infected with human immunodeficiency virus in Kinshasa, Zaire. *Journal of Infectious Diseases*. Sep; **21**(2):167-73.

**Coleman, P.G., Morel, C., Shillcutt, S., Goodman, C., Mills, A.J. (2004).** A threshold analysis of the cost-effectiveness of artemisinin-based combination therapies in sub-saharan Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **71**(2 Suppl):196-204.

**Collins, W.E., Sullivan, J.S., Galland, G.G., Williams, A., Nace, D., Williams, T., Barnwell, J.W. (2005).** *Plasmodium simium* and *Saimiri boliviensis* as a model system for testing candidate vaccines against *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Sep; **73**(3):644-8.

---

**Contacos**, P.G., Lunn, J.S., Coatney, G.R., IKilpatrick, J.W. and Jones, F.E. (1963). Quartan-type malaria parasite of new world monkeys transmissible to man. *Science*. **142**:676.

**Conway**, D.J., Roper, C., Oduola, A.M., Arnot, D.E., Kremsner, P.G., Grobusch, M.P., Curtis, C.F., Greenwood, B.M. (1999). High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. Apr; **96** (8): 4506-4511.

**Conway**, D.J.(2007). Molecular epidemiology of malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. Jan;**20**(1):188-204.

**Cooke**, B.M., Nicoll, C.L., Baruch, D.I., Coppel, R.L. (1998). A recombinant peptide based on PfEMP1 peptide inhibits and reverses adhesion of malaria-infected red blood cells to CD36 under flow. *Molecular Microbiol*. **30**: 83-90.

**Cooper**, R.A., Ferdig, M.T., Su, X.Z., Ursos, L.M., Mu, J., Nomura, T., Fujioka, H., Fidock, D.A., Roepe, P.D. & Wellems, T.E. (2002). Alternative mutations at position 76 of the vacuolar transmembrane protein PfCRT are associated with chloroquine resistance and unique stereospecific quinine and quinidine responses in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Pharmacology*. **61**, 35-42.

**Corcoran**, L.M., Forsyth, K.P., Bianco, A.E., Brown, G.V., Kemp, D.J. (1986). Chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum* can involve deletions and are frequent in natural parasite populations. *Cell*. Jan 17; **44** (1): 87-95.

**Cravo**, P., Rosário, V.E. (2002). Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. *Boletim de Biotecnologia*. Dez; **73**: 2-8.

**Creasey**, A., Fenton, B., Walker, A., Thaithong, S., Oliveira, S., Mutambu, S., Walliker, D. (1990). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **42** (5): 403-13.

**Daily**, J.P., Roberts, C., Thomas, S.M., Ndir, O., Dieng, T., Mboup, S., Wirth, D.F. (2003). Prevalence of *Plasmodium falciparum* *pfprt* polymorphisms and *in vitro* chloroquine sensitivity in Senegal. *Parasitology*. May; **126** (Pt 5): 401-5.

**Delhaes**, L., Blot, C., Berry, L., Maciejewski, L.A., Camus, D., Brocard, J.S., Dive, D. (2000). Novel ferrocenic artemisinin derivatives: synthesis, *in vitro* antimalarial activity and affinity of binding with ferroprotoporphyrin IX. *Bioorg Med Chem*. Dec;**8**(12):2739-45.



---

**Djimde**, A., Doumbo, O.K., Cortese, J.F., Kayentao, K., Doumbo, S., Diourte, Y., Dicko, A., Su, X.Z., Nomura, T., Fidock, D.A., Wellems, T.E., Plowe, C.V., Coulibaly, D. (2001). A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*. Jan 25; **344** (4): 257-63.

**Dokomajilar**, C., Lankoande, Z.M., Dorsey, G., Zongo, I., Ouedraogo, J.B., Rosenthal, P.J. (2006). Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul; **75** (1): 162-165.

**Dorsey**, G., Kanya, M.R., Ndeezi, G., Babirye, J.N., Phares, C.R., Olson, J.E., Katabira, E.T., Rosenthal, P.J. (2000). Predictors of chloroquine treatment failure in children and adults with *falciparum* malaria in Kampala, Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jun; **62**(6):686-92.

**Duah**, N.O., Wilson, M.D., Ghansah, A., Abuaku, B., Edo, D., Quashie, N.B., Koram, K.A. (2007). Mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance genes, and treatment outcomes in Ghanaian children with uncomplicated malaria. *Journal of Tropical Pediatrics*. Feb; **53**(1):27-31.

**Duraisingh**, M.T., Cowman, A.F. (2005). Contribution of the pfmdr1 gene to antimalarial drug resistance. *Acta Tropica*. Jun; **94** (3): 181-190.

**Eckstein-Ludwig**, U., Webb, R.J., Van Goethem, I.D., East, J.M., Lee, A.G., Kimura, M., O'Neill, P.M., Bray, P.G., Ward, S.A., Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. Aug 21; **424** (6951): 957-61.

**English**, M.C., Waruiru, C., Lightowler, C., Murphy, S.A., Kirigha, G., Marsh, K. (1996). Hyponatraemia and dehydration in severe malaria. *Arch Dis Child*. Mar; **74**(3):201-5.

**Famin**, O., Ginsburg, H. (2002). Differential effects of 4-aminoquinoline-containing antimalarial drugs on hemoglobin digestion in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Biochemical Pharmacology*. Feb 1; **63** (3): 393-8.

**Fandeur**, T., Volney, B., Peneau, C., de Thoisy, B. (2000). Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology*. Jan; **120**:11-21.

**Färnert**, A., Tengstam, K., Palme, I.B., Bronner, U., Lebbad, M., Swedberg, G., Björkman, A. (2002). Polyclonal *Plasmodium falciparum* malaria in travelers and selection of antifolate mutations after proguanil prophylaxis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **66**(5):487-91.

**Ferdig**, M.T., Cooper, R.A., Mu, J., Deng, B., Joy, D.A., Su, X.Z., Wellems, T.E. (2004). Dissecting the loci of low-level quinine resistance in malaria parasites. *Molecular Microbiology*. May; **52** (4): 985-97.

---

**Fernandez-Reyes, D.**, Craig, A.G., Kyes, S.A., Peshu, N., Snow, R.W., Berendt, A.R., Marsh, K., Newbold, C.I.(1997).A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet.* Aug;**6**(8):1357-60.

**Ferone, R.** (1977). Folate metabolism in malaria. *Bulletin of the World Health Organization.* **55** (2-3): 291-298.

**Ferreira, I.D.**, Lopes, D., Martinelli, A., Ferreira, C., do Rosário, V.E., Cravo, P. (2007). *In vitro* assessment of artesunate, artemether and amodiaquine susceptibility and molecular analysis of putative resistance-associated mutations of *Plasmodium falciparum* from São Tomé and Príncipe. *Tropical Medicine and International Health.* Mar; **12** (3): 353- 362.

**Ferrer-Rodríguez, I.**, Pérez-Rosado, J., Gervais, G.W., Peters, W., Robinson, B.L., Serrano, A.E. (2004). *Plasmodium yoelii*: identification and partial characterization of an MDR1 gene in an artemisinin-resistant line. *Journal of Parasitology.* Feb; **90** (1): 152-160.

**Florens, L.**, Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., Moch, J.K., Muster, N., Sacci, J.B., Tabb, D.L., Witney, A.A., Wolters, D., Wu, Y., Gardner, M.J., Holder, A.A., Sinden, R.E., Yates, J.R., Carucci, D.J. (2002). A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature.* Oct 3; **419** (6906): 520-6.

**Foley, M.**, Tilley, L. (1997). Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *International Journal of Parasitology.* Feb; **27** (2): 231-40.

**Foote, S.J.**, Thompson, J.K., Cowman, A.F., Kemp, D.J. (1989). Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell.* Jun 16; **57** (6): 921-30.

**Foote, S.J.**, Kyle, D.E., Martin, R.K., Oduola, A.M., Forsyth, K., Kemp, D.J., Cowman, A.F. (1990). Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* May 17; **345** (6272): 255-8.

**Frédérich, M.**, Dogne, J.M., Angenot, L., De Mol, P. (2002). New trends in anti-malarial agents.*Current Medicinal Chemistry.* Aug; **9** (15): 1435-1456.

**Frontali, C.**, Walliker, D., Mons, B. (1991). Genome organization and genetics of *Plasmodium*. *Acta Leiden.* **60** (1): 13-7.

**Gardner, M.J.**, Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.S., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather,

---

M.W., Vaidya, A.B., Martin, D.M., Fairlamb, A.H., Fraunholz, M.J., Roos, D.S., Ralph, S.A., McFadden, G.I., Cummings, L.M., Subramanian, G.M., Mungall, C., Venter, J.C., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Newbold, C., Davis, R.W., Fraser, C.M., Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*. Oct 3; **419** (6906): 498-511.

**Garnham**, P.C. (1998). Malaria parasites of man: life cycle and morphology. Vol 1, London: McGregor.

**Gasasira**, A.F., Dorsey, G., Nzarubara, B., Staedke, S.G., Nassali, A., Rosenthal, P.J., Kamya, M.R. (2003). Comparative efficacy of aminoquinoline-antifolate combinations for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Kampala, Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Feb; **68** (2): 127-32.

**Geary**, T.G., Jensen, J.B., Ginsburg, H. (1986). Uptake of [3H] chloroquine by drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*. Nov 1; **35** (21): 3805-12.

**Giao**, P.T., de Vries, P.J. (2001). Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. *Clin Pharmacokinet*. **40**(5):343-73.

**Ginsburg**, H., Famin, O., Zhang, J., Krugliak, M. (1998). Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical Pharmacology*. Nov 15; **56** (10): 1305-13.

**Ginsburg**, H. (1999). Iron acquisition by *Plasmodium spp*. *Parasitology Today*. Nov; **15** (11):466.

**Glgorijevic**, B., Bennett, T., McAllister, R., Urbach, J.S. & Roepe, P.D. (2006). Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 2. Altered vacuolar volume regulation in drug resistant malaria. *Biochemistry*. **45** ; 12411-23.

**Gomes**, M., Ribeiro, I., Warsame, M., Karunajeewa, H., Petzold, M. (2008). Rectal artemisinins for malaria: a review of efficacy and safety from individual patient data in clinical studies. *BMC Infectious Diseases*. 28;**8**(1):39.

**Gomez-Saladin**, E., Fryauff, D.J., Taylor, W.R., Laksana, B.S., Susanti, A.I., Purnomo, Subianto, B., Richie, T.L. (1999). *Plasmodium falciparum mdr1* mutations and *in vivo* chloroquine resistance in Indonesia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Aug; **61** (2): 240-4.

**Greenberg**, A.E., Ntumbanzondo, M., Ntula, N., Mawa, L., Howell, J., Davachi, F. (1989). Hospital-based surveillance of malaria-related paediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire. *Bulletin of the World Health Organization*. **67**(2):189-96.

---

**Guinovart**, C., Bassat, Q., Sigaúque, B., Aide, P., Sacarlal, J., Nhampossa, T., Bardají, A., Nhacolo, A., Macete, E., Mandomando, I., Aponte, J.J., Menéndez, C., Alonso, P.L. (2008). Malaria in rural Mozambique. Part I: children attending the outpatient clinic. *Malar Journal*. Feb **26**;7:36.

**Hamel**, M.J., Poe, A., Bloland, P., McCollum, A., Zhou, Z., Shi, Y.P., Ouma, P., Otieno, K., Vulule, J., Escalante, A., Udhayakumar, V., Slutsker, L. (2008). Dihydrofolate reductase I164L mutations in *Plasmodium falciparum* isolates: clinical outcome of 14 Kenyan adults infected with parasites harbouring the I164L mutation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Apr; **102**(4):338-45.

**Happi**, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Akinboye, D.O., Yusuf, B.O., Ebong, O.O., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F., Oduola, A.M. (2005). Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Tropica*. Sep; **95**(3):183-93.

**Happi**, C.T., Gbotosho, G.O., Folarin, O.A., Bolaji, O.M., Sowunmi, A., Kyle, D.E., Milhous, W., Wirth, D.F., Oduola, A.M. (2006). Association between mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and *P. falciparum* multidrug resistance 1 genes and in vivo amodiaquine resistance in *P. falciparum* malaria-infected children in Nigeria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul; **75** (1): 155-161.

**Harinasuta**, T., Migasen, S., Boonag, D. (1962). Chloroquine resistance in Thailand. *Unesco 1<sup>st</sup> Regional Symposium on Scientific Knowledge of Tropical Parasites*. Singapore: University of Singapore.

**Hastings**, M.D., Bates, S.J., Blackstone, E.A., Monks, S.M., Mutabingwa, T.K., Sibley, C.H. (2002). Highly pyrimethamine-resistant alleles of dihydrofolate reductase in isolates of *Plasmodium falciparum* from Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 96(6):674-6.

**Hatabu**, T., Kawazu, S., Kojima, S., Sato, K., Singhasivanon, P., Looareesuwan, S., Kano, S. (2005). In vitro susceptibility and genetic variations for chloroquine and mefloquine in *Plasmodium falciparum* isolates from Thai-Myanmar border. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 36 Suppl **4**:73-9.

**Haynes**, R.K., Fugmann, B., Stetter, J., Rieckmann, K., Heilmann, H.D., Chan, H.W., Cheung, M.K., Lam, W.L., Wong, H.N., Croft, S.L., Vivas, L., Rattray, L., Stewart, L., Peters, W., Robinson, B.L., Edstein, M.D., Kotecka, B., Kyle, D.E., Beckermann, B., Gerisch, M., Radtke, M., Schmuck, G., Steinke, W., Wollborn, U., Schmeer, K., Römer, A. (2006). Artemisone – a new, highly active antimalarial drug of the artemisinin class. *Angewandte Chemie International Edition in English*. Mar; **45** (13): 2082-2088.

**Henry**, M., Diallo, I., Bordes, J., Ka, S., Pradines, B., Diatta, B., M'Baye, P.S., Sane, M., Thiam, M., Gueye, P.M., Wade, B., Touze, J.E., Debonne, J.M., Rogier, C., Fusai, T. (2006). Urban malaria in Dakar, Senegal:

---

chemosusceptibility and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jul; **75** (1): 146-151.

**Hien**, T.T., White, N.J. (1993). Qunghaosu. *Lancet*. Mar; **341** (8845): 603-608.

**Holmgren**, G., Björkman, A., Gil, J.P. (2006). Amodiaquine resistance is not related to rare findings of pfmdr1 gene amplifications in Kenya. *Tropical Medicine and International Health*. Dec; **11** (12): 1808-1812.

**Holmgren**, G., Hamrin, J., Svärd, J., Martensson, A., Gil, J.P., Björkman, A. (2007). Selection of pfmdr1 mutations after amodiaquine monotherapy and amodiaquine plus artemisinin combination therapy in East Africa. *Infection, genetics and evolution*. Sep; **7** (5): 562- 569.

**Huaman**, M.C., Roncal, N., Nakazawa, S., Long, T.T., Gerena, L., Garcia, C., Solari, L., Magill, A.J., Kanbara, H. (2004). Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and *in vitro* susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **70** (5): 461-6.

**Hunt**, P., Afonso, A., Creasey, A., Culleton, R., Sidhu, A.B., Logan, J., Valderramos, S.G., McNae, I., Cheesman, S., Rosario, V.D., Carter, R., Fidock, D.A., Cravo, P. (2007). Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate and chloroquine resistant rodent malaria parasites. *Molecular Microbiology*. Jul; **65** (1): 27-40.

**Hyman**, R.W., Fung, E., Conway, A., Kurdi, O., Mao, J., Miranda, M., Nakao, B., Rowley, D., Tamaki, T., Wang, F., Davis, R.W. (2002). Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosome 12. *Nature*. Oct 3; **419** (6906): 534-7.

**IDS.**: Inquérito Demográfico de Saúde., 2003

**INS.**: Instituto Nacional de Saúde (1981). A endemia da malária no vale do Limpopo

**I.P.C.C.**: *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. (2007). M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 976pp.

**Ittarat**, W., Sreepian, A., Srisarin, A., Pathephotivong, K. (2003). Effect of dihydroartemisinin on the antioxidant capacity of *P. falciparum* infected erythrocytes. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. Dec; **34** (4): 744-750.

**Iyer**, J.K., Milhous, W.K., Cortese, J.F., Kublin, J.G., Plowe, C.V. (2001). *Plasmodium falciparum* cross-resistance between trimethoprim and pyrimethamine. *Lancet*. Sep 29;**358**(9287):1066-7.

---

**Jafari, S., Le Bras, J., Asmar, M., Durand, R. (2003).** Molecular survey of *Plasmodium falciparum* resistance in south-eastern Iran. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Mar; **97** (2): 119-24.

**Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M.T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T., Mercereau-Puijalon, O. (2005).** Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*. Dec; **366** (3): 1960-1963.

**Jelinek, T., Rønn, A.M., Curtis, J., Duraisingh, M.T., Lemnge, M.M., Mhina, J., Bygbjerg, I.C., Warhurst, D.C. (1997).** High prevalence of mutations in the dihydrofolate reductase gene of *Plasmodium falciparum* in isolates from Tanzania without evidence of an association to clinical sulfadoxine/pyrimethamine resistance. *Tropical Medicine and International Health*. Nov;**2**(11):1075-9.

**Jelinek, T., Rønn, A.M., Lemnge, M.M., Curtis, J., Mhina, J., Duraisingh, M.T., Bygbjerg, I.C., Warhurst, D.C. (1998).** Polymorphisms in the dihydrofolate reductase (DHFR) and dihydropteroate synthetase (DHPS) genes of *Plasmodium falciparum* and in vivo resistance to sulphadoxine/pyrimethamine in isolates from Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*. Aug;**3**(8):605-9.

**Kahigwa, E., Schellenberg, D., Sanz, S., Aponte, J.J., Wigayi, J., Mshinda, H., Alonso, P., Menendez, C. (2002).** Risk factors for presentation to hospital with severe anaemia in Tanzanian children: a case-control study. *Tropical Medicine and International Health*. Oct;**7**(10):823-30.

**Knell, A.J. (1991).** Malaria. Oxford: The Wellcome Trust, Oxford University

**Koram, K.A., Bennett, S., Adiamah, J.H., Greenwood, B.M. (1995).** Socio-economic determinants are not major risk factors for severe malaria in Gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Mar-Apr;**89**(2):151-4.

**Koram, K.A., Abuaku, B., Duah, N., Quashie, N. (2005).** Comparative efficacy of antimalarial drugs including ACTs in the treatment of uncomplicated malaria among children under 5 years in Ghana. *Acta Tropica*. **95**(3):194-203.

**Kovats, R.S., Campbell-Lendrum, D.H., McMichael, A.J., Woodward, A., Cox, J.S. (2001).** Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jul 29;**356**(1411):1057-68.

**Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Herwaldt, B.L., Schlesinger, P.H., Wellems, T.E. (1992).** Energy dependence of chloroquine accumulation and chloroquine efflux in *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*. Jan 9; **43** (1): 57-62.

---

**Kublin, J.G., Dzinjalama, F.K., Kamwendo, D.D., Malkin, E.M., Cortese, J.F., Martino, L.M., Mukadam, R.A., Rogerson, S.J., Lescano, A.G., Molyneux, M.E., Winstanley, P.A., Kun, J.F., Klabunde, J., Lell, B., Luckner, D., Alpers, M., May, J. (1999)** Association of the ICAM-1 Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **61**: 776–779.

**Kyabayinze, D., Cattamanchi, A., Kanya, M.R., Rosenthal, P.J., Dorsey, G. (2003).** Validation of a simplified method for using molecular markers to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in African children with falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. Sep;69(3):247-52.

**Kyosiimire-Lugemwa, J., Nalunkuma-Kazibwe, A.J., Mujuzi, G., Mulindwa, H., Talisuna, A., Egwang, T.G. (2002).** The Lys-76-Thr mutation in PfCRT and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Jan-Feb; **96** (1): 91-95.

**Labbe, A.C., Bualombai, P., Pillai, D.R., Zhong, K.J., Vanisaveth, V., Hongvanthong, B., Looareesuwan, S. & Kain, K.C. (2001).** Molecular markers for chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand and Laos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **95**,781-8.

**Lackritz, E.M., Campbell, C.C., Ruebush, T.K., Hightower, A.W., Wakube, W., Steketee, R.W., Were, J.B. (1992).** Effect of blood transfusion on survival among children in a Kenyan hospital. *Lancet*. Aug 29;340(8818):524-8.

**Lanzer, M., de Bruin, D., Wertheimer, S.P., Ravetch, J.V. (1994).** Organisation of chromosomes in *Plasmodium falciparum*: a model for generating karyotypic diversity. *Parasitology Today*. Mar; **10** (3): 114-117.

**Le Bras, J., Durand, R. (2003).** The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. Apr; **17** (2): 147-53.

**Li, X.Q., Björkman, A., Andersson, T.B., Ridderström, M., Masimirembwa, C.M. (2002).** Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther*. Feb;300(2):399-407.

**Lim, P., Chy, S., Arie, F., Incardona, S., Chim, P., Sem, R., Denis, M.B., Hewitt, S., Hoyer, S., Socheat, D., Merecreau-Puijalon, O., Fandeur, T. (2003).** *pfcr* polymorphism and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* strains isolated in Cambodia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Jan; **47** (1): 87-94.

**Lim, C.S., Tazi, L., Ayala, F.J. (2005).** *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 25;102(43):15523-8.

---

**Looareesuwan**, S., Wilairatana, P., Molunto, W., Chalermrut, K., Oliaro, P., Andrial, M. (1997). A comparative clinical trial of sequential treatments of severe malaria with artesunate suppository followed by mefloquine in Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Sep; **57** (3): 348-53.

**Lopes**, D., Nogueira, F., Gil, J.P., Ferreira, C., do Rosario, V.E., Cravo, P. (2002). *pfprt* and *pfmdr1* mutations and chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Sao Tome and Principe, West Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Dec; **96** (8): 831-4.

**Maberti**, S. (1960). Desarrollo de resistencia a la pirimetamina. Presentacion de 15 casos estudiados en Trujillo. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical Y Parasitologia Medica*. **3**: 239-259.

**Macete**, E., Aide, P., Aponte, J.J., Sanz, S., Mandomando, I., Espasa, M., Sigauque, B., Dobaño, C., Mabunda, S., DgeDge, M., Alonso, P., Menendez, C. (2006). Intermittent preventive treatment for malaria control administered at the time of routine vaccinations in Mozambican infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis*. Aug 1;**194**(3):276-85.

**Macete**, E.V., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Navia, M.M., Milman, J., Guinovart, C., Mandomando, I., López-Púa, Y., Lievens, M., Owusu-Ofori, A., Dubois, M.C., Cahill, C.P., Koutsoukos, M., Sillman, M., Thompson, R., Dubovsky, F., Ballou, W.R., Cohen, J., Alonso, P.L. (2007a). Evaluation of two formulations of adjuvanted RTS, S malaria vaccine in children aged 3 to 5 years living in a malaria-endemic region of Mozambique: a Phase I/IIb randomized double-blind bridging trial. *Trials*. Mar **26**:8:11.

**Macete**, E., Aponte, J.J., Guinovart, C., Sacarlal, J., Ofori-Anyinam, O., Mandomando, I., Espasa, M., Bevilacqua, C., Leach, A., Dubois, M.C., Heppner, D.G., Tello, L., Milman, J., Cohen, J., Dubovsky, F., Tornieporth, N., Thompson, R., Alonso, P.L. (2007b). Safety and immunogenicity of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1-4 in Mozambique. *Trop Med Int Health*. Jan;**12**(1):37-46.

**MacPherson**, G.G., Warrell, M.J., White, N.J., Looareesuwan, S. and Warrell, D.A. (1985). Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am. J. Pathol*. **119**, 385-401.

**MacPherson**, D.W., Gushulak, B.D., Macdonald, L. (2007). Health and foreign policy: influences of migration and population mobility. *Bulletin of the World Health Organization*. Mar; **85** (3): 200-206.

**Maguire**, J.D., Susanti, A.I., Krisin, Sismadi, P., Fryauff, D.J., Baird, J.K. (2001). The T76 mutation in the *pfprt* gene of *Plasmodium falciparum* and clinical chloroquine resistance phenotypes in Papua, Indonesia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Sep; **95** (6): 559-72.



---

**Malamba S**, Hladik W, Reingold A, Banage F, McFarland W, Rutherford G, Mimbe D, Nzaro E, Downing R, Mermin J.(2007).The effect of HIV on morbidity and mortality in children with severe malarial anaemia. *Malar Journal*. Oct **31**;6:143.

**Marks**, F., Evans, J., Meyer, C.G., Browne, E.N., Flessner, C., von Kalckreuth, V., Eggelte, T.A., Horstmann, R.D., May, J. (2005). High prevalence of markers for sulfadoxine and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in the absence of drug pressure in the Ashanti region of Ghana. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**: 1101–1105.

**Marsh**, K., Forster, D., Waruiru, C. (1995). Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med*. 332:1399-1404.

**Mayor**, A.G., Gómez-Olivé, X., Aponte, J.J., Casimiro, S., Mabunda, S., Dgedge, M., Barreto, A., Alonso, P.L. (2001). Prevalence of the K76T mutation in the putative *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter (pfcr1) gene and its relation to chloroquine resistance in Mozambique. *J Infect Dis*. May 1;**183**(9):1413-6.

**Mbugi**, E.V., Mutayoba, B.M., Malisa, A.L., Balthazary, S.T., Nyambo,T.B., Mshinda, H. (2006). Drug resistance to sulphadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria in Mlimba, Tanzania. *Malaria Journal*. Oct **31**;5:94.

**McCollum**, A.M., Poe, A.C., Hamel, M., Huber, C., Zhou, Z., Shi, Y.P., Ouma, P., Vulule, J., Bloland, P., Slutsker, L., Barnwell, J.W., Udhayakumar, V., Escalante, A.A. (2006). Antifolate resistance in *Plasmodium falciparum*: multiple origins and identification of novel dhfr alleles. *Journal of Infectious Diseases*. Jul 15;**194**(2):189-97.

**Menard**, D., Yapou, F., Manirakiza, A., Djalle, D., Matsika-Claquin, M.D., Talarmin, A.. (2006). Polymorphisms in pfcr1, pfmdr1, dhfr genes and in vitro responses to antimalarials in *Plasmodium falciparum* isolates from Bangui, Central African Republic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Sep; **75** (3): 381-387.

**Menezes**, C.M., Kirchgatter, K., Di Santi, S.M., Paula, G.A., Ferreira, E.I. (2001). *In vitro* evaluation of quinidine sensitivity in Brazilian *Plasmodium falciparum* isolates: comparative analysis to quinine and chloroquine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. Jul- Aug; **43** (4): 221-6.

**Meshnick**, S.R. (2002). Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal of Parasitology*. Dec; **32** (13): 1655-1660.

**Mihaly**, G.W., Date, N.M., Ireton, H.J., Smallwood, R.A. (1987). The effect of malaria infection on primaquine elimination in the isolated perfused rat liver. *Biochem Pharmacol*. **36**(2): 225-8.

---

**Miller**, L.H. (1994). Impact of malaria on genetic polymorphisms and genetic diseases in African and African American. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **91**: 2415-2419.

**Miller**, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*. **415**: 673-678.

**Modiano**, D., Petrarca, V., Sirima, B.S., Nebie, I., Diallo, D., Esposito, F., Coluzzi, M. (1996). Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **93**: 13206-13211.

**Molta**, N.B., Oguche, S., Pam, S.D., Omalu, I.C., Afolabi, B.M., Odujoko, J.B., Amajoh, C.N., Adeniji, B., Wuyep, V.P., Ekanem, O.J. (2003). Amodiaquine treatment of uncomplicated malaria in children, in an area of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in northcentral Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Oct; **97** (7): 663-9.

**Molyneux**, M. E. (1989). Malaria - clinical features in children. *Journal of the Royal Society of Medicine Supplement*. **82**(17).

**Moore**, D.V., Lanier, J.E. (1961). Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Jan; **10**: 5-9.

**Morgan**, E.T. (2001). Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos*. **29**(3):207-12.

**Mu**, J., Ferdig, M.T., Feng, X., Joy, D.A., Duan, J., Furuya, T., Subramanian, G., Aravind, L., Cooper, R.A., Wootton, J.C., Xiong, M. & Su, X.Z. (2003). Multiple transporters associated with malaria parasite responses to chloroquine and quinine. *Mol Microbiol*. **49**, 977-89.

**Mugittu**, K., Ndejmbi, M., Malisa, A., Lemnge, M., Premji, Z., Mwita, A., Nkya, W., Kataraihya, J., Abdulla, S., Beck, H.P., Mshinda, H. (2004). Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and prevalence of resistance markers in Tanzania prior to revision of malaria treatment policy: *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase mutations in monitoring in vivo resistance. *Am J Trop Med Hyg*. Dec; **71**(6):696-702.

**Müller**, O., Traoré, C., Jahn, A., Becher, H. (2003). Severe anaemia in west African children: malaria or malnutrition? *Lancet*. 2003 Jan 4; **361**(9351):86-7.

**Murphy**, G.S., Bastri, H., Purnomo, Andersen, E.M., Bangs, M.J., Mount, D.L., Gorden, J., Lal, A.A., Purwokusumo, A.R., Harjosuwarno, S. (1993). *Vivax* malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. *Lancet*. Jan 9; **341** (8837): 96-100.

- 
- Musoke**, L.K. (1966). Neurological manifestations of malaria in children. *East Afr Med J*. Nov;**43**(11):561-4.
- Nagesha**, H.S., Din-Syafuruddin, Casey, G.J., Susanti, A.I., Fryauff, D.J., Reeder, J.C., Cowman, A.F. (2001). Mutations in the *pfmdr1*, *dhfr* and *dhps* genes of *Plasmodium falciparum* are associated with *in-vivo* drug resistance in West Papua, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Jan-Feb; **95**(1):43-9.
- Nakajima**, M., Fujiki, Y., Noda, K., Ohtsuka, H., Ohkuni, H., Kyo, S., Inoue, M., Kuroiwa, Y., Yokoi, T. (2003). Genetic polymorphisms of CYP2C8 in Japanese population. *Drug Metab Dispos*. **31**:687–690.
- Ndiaye**, D., Daily, J.P., Sarr, O., Ndir, O., Gaye, O., Mboup, S., Wirth, D.F. (2005). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in Senegal. *Trop Med Int Health*. Nov;**10**(11):1176-9.
- Ndiaye**, D., Daily, J.P., Sarr, O., Ndir, O., Gaye, O., Mboup, S., Roper, C., Wirth, D.F. (2006). Defining the origin of *Plasmodium falciparum* resistant dhfr isolates in Senegal. *Acta Trop*. Aug;**99**(1):106-11.
- Ndounga**, M., Tahar, R., Basco, L.K., Casimiro, P.N., Malonga, D.A., Ntoumi, F. (2007). Therapeutic efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and the prevalence of molecular markers of resistance in under 5-year olds in Brazzaville, Congo. *Trop Med Int Health*. Oct;**12**(10):1164-71.
- Newbold**, C.I., Craig, A.G., Kyes, S., Berendt, A.R., Snow, R.W., Peshu, N., Marsh, K. (1997). PfEMP1, polymorphism and pathogenesis. *Ann Trop Med Parasitol*. Jul;**91**(5):551-7.
- Newton**, C.R., Marsh, K., Peshu, N., Mwangi, I. (1992). Blood transfusions for severe anaemia in African children. *Lancet*. Oct 10;**340**(8824):917-8.
- Newton**, C.R., Taylor, T.E., Whitten, R.O. (1998). Pathophysiology of fatal *falciparum* malaria in African children. *Am J Trop Med Hyg*. **58**: 673-683.
- Ngo**, T., Duraisingh, M., Reed, M., Hipgrave, D., Biggs, B., Cowman, A.F. (2003). Analysis of *pfcr*, *pfmdr1*, *dhfr*, and *dhps* mutations and drug sensitivities in *Plasmodium falciparum* isolates from patients in Vietnam before and after treatment with artemisinin. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Mar; **68** (3): 350-6.
- Nosten**, F., Price, R.N. (1995). New antimalarials. A risk-benefit analysis. *Drug Saf*. Apr;**12**(4):264-73.
- Nsimba**, B., Jafari-Guemouri, S., Malonga, D.A., Mouata, A.M., Kiori, J., Louya, F., Yocka, D., Malanda, M., Durand, R., Le Bras, J. (2005). Epidemiology of drug-resistant malaria in Republic of Congo: using molecular

---

evidence for monitoring antimalarial drug resistance combined with assessment of antimalarial drug use. *Trop Med Int Health*. Oct; **10**(10):1030-7.

**Nsoby**, S.L., Dokomajilar, C., Joloba, M., Dorsey, G., Rosenthal, P.J. (2007). Resistance mediating *Plasmodium falciparum* pfcrt and pfmdr1 alleles after treatment with artesunate-amodiaquine in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Aug; **51** (8): 3023-3025.

**Nzila**, A.M., Mberu, E.K., Sulo, J., Dayo, H., Winstanley, P.A., Sibley, C.H., Watkins, W.M. (2000). Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Apr; **44** (4): 991-6.

**Nzila**, A., Ochong, E., Nduati, E., Gilbert, K., Winstanley, P., Ward, S., Marsh, K.(2005). Why has the dihydrofolate reductase 164 mutation not consistently been found in Africa yet ? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **99**(5):341-6.

**Ochong**, E.O., van den Broek, I.V., Keus, K., Nzila, A. (2003). Short report: association between chloroquine and amodiaquine resistance and allelic variation in the *Plasmodium falciparum* multiple drug resistance 1 gene and the chloroquine resistance transporter gene in isolates from the upper Nile in southern Sudan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Aug; **69** (2): 184-7.

**Ohyama**, K., Nakajima, M., Nakamura, S., Shimada, N., Yamazaki, H., and Yokoi, T. (2000) A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone *N*-deethylation: An approach to predict the contribution with relative activity factor. *Drug Metab Dispos*. **28**: 1303-1310.

**Ojurongbe**, O., Ogungbamigbe, T.O., Fagbenro-Beyioku, A.F., Fendel, R., Kremsner, P.G., Kun, J.F. (2007). Rapid detection of Pfcrt and Pfmdr1 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates by FRET and in vivo response to chloroquine among children from Osogbo, Nigeria. *Malar J*. Apr **11**;6:41.

**Olliaro**, P., Nevill, C., LeBras, J., Ringwald, P., Mussano, P., Garner, P., Brasseur, P. (1996) Systematic review of amodiaquine treatment in uncomplicated malaria. *Lancet* . **348**:1196–1201.

**Olliaro**, P., Mussano, P. (2003). Amodiaquine for treating malaria. *Cochrane Database Systems Review* (2): CD000016.

**Olliaro**, P.L., Taylor, W.R. (2004). Developing artemisinin based drug combinations for the treatment of drug resistant *falciparum* malaria: A review. *Journal of Postgraduate Medicine*. Jan-Mar; **50** (1): 40-4.

- 
- Olumese**, P.E., Sodeinde, O., Gbadegesin, R.A., Nafiu, O., Oguche, S., Walker, O. (1995). Respiratory distress adversely affects the outcome of childhood cerebral malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Nov-Dec; **89**(6):634.
- Omar**, S.A., Adagu, I.S., Warhurst, D.C. (2001). Can pretreatment screening for dhps and dhfr point mutations in *Plasmodium falciparum* infections be used to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* May-Jun; **95**(3):315-9.
- Ouellette**, M., Legare, D., Papadopoulou, B. (2001). Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.* Apr; 3 (2): 201-6.
- Pain**, A., Urban, B.C., Kai, O., Casals-Pascual, C., Shafi, J., Marsh, K., Roberts, D.J. (2001) A non-sense mutation in CD36 gene is associated with protection from severe malaria. *Lancet.* **357**: 1502-1503.
- Pandey**, A.V., Tekwani, B.L., Singh, R.L., Chauhan, V.S. (1999). Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *Journal of Biology and Chemistry.* Jul 2; **274** (27): 19383-8.
- Parise**, M.E., Ayisi, J.G., Nahlen, B.L., Schultz, L.J., Roberts, J.M., Misore, A., Muga, R., Oloo, A.J., Steketee, R.W. (1998). Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of placental malaria in an area of Kenya with a high prevalence of malaria and human immunodeficiency virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* Nov; **59**(5):813-22.
- Pasloske**, B.L., Howard, R.J. (1994). Malaria, the red cell, and the endothelium. *Annu Rev Med*; **45**:283-95.
- Peel**, S.A. (2001). The ABC transporter genes of *Plasmodium falciparum* and drug resistance. *Drug Resistance Update.* Feb; **4** (1): 66-74.
- Peterson**, D.S., Walliker, D., Wellems, T.E. (1988). Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.* Dec; **85** (23): 9114-8.
- Peterson**, D.S., Di Sianti, S.M., Pova, M., Calvosa, V.S., do Rosario, V.E., Wellems, T.E. (1991). Prevalence of dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis of pyrimethamine-resistant *falciparum* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* **45**:492-7.
- Pickard**, A. L., C. Wongsrichanalai, A. Purfield, D. Kamwendo, K. Emery, C. Zalewski, F. Kawamoto, R. S. Miller, and S. R. Meshnick. (2003). Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2418-2423.

---

**Plummer**, W.B., Pereira, L.M.P., Carrington, C.V.F. (2004). *Pfprt* and *pfmdr1* Alleles Associated with Chloroquine Resistance in *Plasmodium falciparum* from Guyana, South America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. Jun; **99** (4): 389-392.

**PNCM**: Programa Nacional de Controlo da Malária, Ministério da Saúde, Moçambique

**Plowe**, C.V., Cortese, J.F., Djimde, A., Nwanyanwu, O.C., Watkins, W.M., Winstanley, P.A., Estrada-Franco, J.G., Mollinedo, R.E., Avila, J.C., Cespedes, J.L., Carter, D., Doumbo, O.K. (1997). Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis*. **176**:1590-1596

**Povoa**, M.M., Adagu, I.S., Oliveira, S.G., Machado, R.L., Miles, M.A., Warhurst, D.C. (1998). *Pfmdr1* Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and -sensitive Brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Experimental Parasitology*. Jan; **88** (1): 64-8.

**Price**, R.N., Uhlemann, A.C., Brockman, A., McGready, R., Ashley, E., Phaipun, L., Patel, R., Laing, K., Looareesuwan, S., White, N.J., Nosten, F., Krishna, S. (2004). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*. Jul; **364** (9432): 438-447.

**Rahman**, A., Korzekwa, K.R., Grogan, J., Gonzalez, F.J., and Harris, J.W. (1994). Selective biotransformation of taxol to 6 $\alpha$ -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res*. **54**: 5543-5546.

**Rallón**, N.I., Osorio, L.E., Giraldo, L.E. (1999). Lack of an association between the ASN-108 mutation in the dihydrofolate reductase gene and in vivo resistance to sulfadoxine/pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. Aug;**61**(2):245-8.

**Raman**, J., Sharp, B., Kleinschmidt, I., Roper, C., Streat, E., Kelly, V., Barnes, K.I.(2008). Differential effect of regional drug pressure on dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase mutations in southern Mozambique. *Am J Trop Med Hyg*. Feb;**78**(2):256-61.

**Ramharter**, M., Burkhardt, D., Nemeth, J., Adegnika, A.A., Kremsner, P.G. (2006). *In vitro* activity of artemisone compared with artesunate against *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Oct; **75** (4): 637-639.

**Reed**, M.B., Saliba, K.J., Caruana, S.R., Kirk, K., Cowman, A.F. (2000). Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. Feb 24; **403** (6772): 906-9.

---

**Robert, A.**, Benoit-Vical, F., Dechy-Cabaret, O., Meunier, B.. 2001. From classical antimalarial drugs to new compounds based on the mechanism of action of artemisinin. *Pure and Applied Chemistry*. **73** (7): 1173-1188.

**Roche, J.**, Guerra-Neira, A., Raso, J., Benito, A. (2003). Surveillance of *in vivo* resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs from 1992 to 1999 in Malabo (Equatorial Guinea). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **68** (5): 598-601.

**Rogerson, S.J.**, Tembenu, R., Dobaño, C., Plitt, S., Taylor, T.E., Molyneux, M.E. (1999). Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*- infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**(3): 467-472.

**Roper, C.**, Pearce, R., Bredenkamp, B., Gumede, J., Drakeley, C., Mosha, F., Chandramohan, D., Sharp, B. (2003). Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet*. Apr 5;**361**(9364):1174-81.

**Rosário, V.** (1981). Cloning of naturally occurring mixed infections of malaria parasites. *Science*. May 29; **212** (4498): 1037-8.

**Sarr, O.**, Myrick, A., Daily, J., Diop, B.M., Dieng, T., Ndir, O., Sow, P.S., Mboup, S., Wirth, D.F. (2005). In vivo and in vitro analysis of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *Parasitol Res.* Sep;**97**(2):136-40.

**Schellenberg, D.**, Menendez, C., Kahigwa, E., Aponte, J., Vidal, J., Tanner, M., Mshinda, H., Alonso, P. (2001). Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in Tanzanian infants: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. May **12**;357(9267):1471-7.

**Schmider, N.**, Peyerl-Hoffmann, G., Restrepo, M., Jelinek, T. (2003). Short communication: point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trop Med Int Health*. Feb;**8**(2):129-32.

**Schwalbach, J.F.L. & De La Monza, M.C.R.** (1985). A malária em Mozambique. Insitituto Nacional de Saúde. Maputo.

**Schwobel, B.**, Jordan, S., Vanisaveth, V., Phetsouvanh, R., Christophel, E.M., Phompida, S., von Sonnenburg, F., Jelinek, T. (2003). Therapeutic efficacy of chloroquine plus sulphadoxine/ pyrimethamine compared with monotherapy with either chloroquine or sulphadoxine/ pyrimethamine in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Laos. *Tropical Medicine and International Health*. Jan; **8** (1): 19-24.

- 
- Severini, C.,** Menegon, M., Sannella, A.R., Paglia, M.G., Narciso, P., Matteelli, A., Gulletta, M., Caramello, P., Canta, F., Xayavong, M.V., Moura, I.N., Pieniazek, N.J., Taramelli, D., Majori, G. (2006). Prevalence of *pfprt* point mutations and level of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Africa. *Infection, Genetics and Evolution*. Jul; **6** (4): 262-268.
- Serghides, L.,** Smith, T.G., Patel, S.N., Kain, K.C. (2003) CD36 and malaria: friends or foes? *Trends in Parasitology*. **19**: 461-469.
- Sharp, B.L.,** Kleinschmidt, I., Streat, E., Maharaj, R., Barnes, K.I., Durrheim, D.N., Ridl, F.C., Morris, N., Seocharan, I., Kunene, S.L.A., Grange, J.J., Mthembu, J.D., Maartens, F., Martin, C.L., Barreto, A. (2007). Seven years of regional malaria control collaboration--Mozambique, South Africa, and Swaziland. *Am J Trop Med Hyg*. Jan;**76**(1):42-7.
- Shakoor, O.,** Taylor, R.B., Behrens, R.H. (1997). Assessment of the incidence of substandard drugs in developing countries. *Tropical Medicine and International Health*. Sep; **2** (9): 839-45.
- Sibley, C.H.,** Hyde, J.E., Sims, P.F., Plowe, C.V., Kublin, J.G., Mberu, E.K., Cowman, A.F., Winstanley, P.A., Watkins, W.M., Nzila, A.M. (2001). Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*. **17** (12): 582–88.
- Sidhu, A.B.,** Verdier-Pinard, D., Fidock, D.A. (2002) Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by *pfprt* mutations. *Science*. Oct 4; **298** (5591): 210-3.
- Sidhu, A.B.,** Valderramos, S.G., Fidock, D.A. (2005). *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology*. Aug; **57** (4): 913-926.
- Sidhu, A.B.,** Uhlemann, A.C., Valderramos, S.G., Valderramos, J.C., Krishna, S. & Fidock, D.A. (2006). Decreasing *pfmdr1* copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*. **194**, 528-35.
- Sinden, R.E.,** Hartley, R.H., Winger, L. (1985). The development of *Plasmodium* ookinetes *in vitro*: an ultrastructural study including a description of meiotic division. *Parasitology*. Oct; **91** (Pt 2): 227-244.
- Singh, B.,** Bobogare, A., Cox-Singh, J., Snounou, G., Abdullah, M.S., Rahman, H.A.(1999).A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg*. Apr;**60**(4):687-92.



---

**Sinnis, P., Wellems, T.E. (1988).** Long-range restriction maps of *Plasmodium falciparum* chromosomes: crossingover and size variation among geographically distant isolates. *Genomics*. Nov; **3** (4): 287-95.

**Sirawaraporn, W., Yongkiettrakul, S., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D.V. (1997).** *Plasmodium falciparum*: asparagine mutant at residue 108 of dihydrofolate reductase is an optimal antifolate-resistant single mutant. *Exp Parasitol*. **87**(3):245-52.

**Slater, A.F., Swiggard, W.J., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A., Henderson, G.B. (1991).** An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. Jan 15; **88** (2): 325-9.

**Slutsker, L., Taylor, T.E., Wirima, J.J., Steketee, R.W.(1994).**In-hospital morbidity and mortality due to malaria-associated severe anaemia in two areas of Malawi with different patterns of malaria infection.*Trans R Soc Trop Med Hyg*. Sep; **88**(5):548-51.

**Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., Brown, K.N. (1993).** Identification of the four human malaria parasites species in field samples by polymerase chain reaction and detection of high prevalence of mixed infections. *Molecular Biochemical Parasitology*. **58**: 283-292.

**Sowunmi, A., Adediji, A.A., Fateye, B.A., Babalola, C.P. (2004).** *Plasmodium falciparum* hyperparasitaemia in children. Risk factors, treatment outcomes, and gametocytaemia following treatment. *Parasite*. Sep;**11**(3):317-23.

**Staedke, S.G., Mpimbaza, A., Kanya, M.R., Nzarubara, B.K., Dorsey, G., Rosenthal, P.J. (2004).** Combination treatments for uncomplicated *falciparum* malaria in Kampala, Uganda: randomised clinical trial. *Lancet*. Nov 27-Dec 3;**364**(9449):1950-7.

**Sullivan, D.J. Jr, Matile, H., Ridley, R.G., Goldberg, D.E. 1998.** A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines. *Journal of Biology and Chemistry*. Nov 20; **273** (47): 31103-7.

**Sutanto, I., Supriyanto, S., Ruckert, P., Purnomo, Maguire, J.D., Bangs, M.J. (2004).** Comparative efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria and impact on gametocyte carriage rates in the East Nusatenggara province of Indonesia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **70** (5): 467-73.

**Talisuna, A.O., Kyosiimire-Lugemwa, J., Langi, P., Mutabingwa, T.K., Watkins, W., Van Marck, E., Egwang, T., D'Alessandro, U. (2002).** Role of the *pfcr*t codon 76 mutation as a molecular marker for population-based surveillance of chloroquine (CQ)-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Ugandan sentinel sites with high CQ resistance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Sep-Oct; **96** (5): 551-6.

---

**Talisuna**, A.O., Nalunkuma-Kazibwe, A., Bakyaita, N., Langi, P., Mutabingwa, T.K., Watkins, W.W., Van Marck, E., D'Alessandro, U., Egwang, T.G. (2004). Efficacy of sulphadoxinepyrimethamine alone or combined with amodiaquine or chloroquine for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Ugandan children. *Tropical Medicine and International Health*. Feb; **9** (2): 222-9.

**Thera**, M.A., Sehdev, P.S., Coulibaly, D., Traore, K., Garba, M.N., Cissoko, Y., Kone, A., Guindo, A., Dicko, A., Beavogui, A.H., Djimde, A.A., Lyke, K.E., Diallo, D.A., Doumbo, O.K., Plowe, C.V. (2005). Impact of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis on *falciparum* malaria infection and disease. *J Infect Dis*. Nov 15; **192**(10):1823-9.

**Thomas**, S.M., Ndir, O., Dieng, T., Mboup, S., Wypij, D., Maguire, J.H., Wirth, D.F. (2002). *In vitro* chloroquine susceptibility and PCR analysis of *pfert* and *pfmdr1* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **66** (5): 474-80.

**Tinto**, H., Guekoun, L., Zongo, I., Guiguemdé, R.T., D'Alessandro, U., Ouédraogo, J.B. (2008). Chloroquine-resistance molecular markers (Pfert T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health*. Feb; **13**(2):238-40.

**Trampuz**, A., Jereb, M., Muzlovic, I., Prabhu, R.M. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Crit Care*. Aug; **7**(4):315-23.

**Traore** B, Muanza K, Looareesuwan S, Supavej S, Khusmith S, Danis M, Viriyavejakul P, Gay F. (2000). Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates in Thailand using an *in vitro* human lung endothelial cells model. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **62**(1): 38-44.

**Triglia**, T., Foote, S.J., Kemp, D.J., Cowman, A.F. (1991). Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. *Molecular Cell Biology*. Oct; **11** (10): 5244-50.

**Triglia**, T., Cowman, A.F. (1994). Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences US A*. Jul 19; **91** (15): 7149-53.

**Trotta**, R.F., Brown, M.L., Terrell, J.C., Geyer, J.A. (2004). Defective DNA repair as a potential mechanism for the rapid development of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*. May 4; **43** (17): 4885-91.

**Turner**, G.D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T.M., Looareesuwan, S., Buley, I.D., Gatter, K.C., Newbold, C.I., Pukritayakamee, S., Nagachinta, B. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria.

---

Evidence for widespread endothelial activation and potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol.* **145**, 1057-1069.

**Uhlemann**, A.C., Cameron, A., Eckstein-Ludwig, U., Fischbarg, J., Iserovich, P., Zuniga, F.A., East, M., Lee, A., Brady, L., Haynes, R.K., Krishna, S. (2005). A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. *Nature Structural and Molecular Biology*. Jun; **12** (7): 628-629.

**Ursing**, J., Kofoed, P.E., Rodrigues, A., Rombo, L., Gil, J.P. (2007). *Plasmodium falciparum* genotypes associated with chloroquine and amodiaquine resistance in Guinea-Bissau. *Am J Trop Med Hyg.* May; **76**(5):844-8.

**Van Geertruyden**, J.P., Mulenga, M., Kasongo, W., Polman, K., Colebunders, R., Kestens, L., D'Alessandro, U. (2006). CD4 T-cell count and HIV-1 infection in adults with uncomplicated malaria. *J Acquir Immune Defic Syndr.* Nov 1; **43**(3):363-7.

**Vennerstrom**, J.L., Ager, A.L. Jr., Andersen, S.L., Grace, J.M., Wongpanich, V., Angerhofer, C.K., Hu, J.K., Wesche, D.L. (2000). Assessment of the antimalarial potential of tetraoxane WR 148999. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. May; **62** (5): 573-8.

**Vivas**, L., Rattray, L., Stewart, L.B., Robinson, B.L., Fugmann, B., Haynes, R.K., Peters, W., Croft, S.L. (2007). Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semisynthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Apr; **59** (4): 658-665.

**Walker**, O., Salako, L.A., Sowunmi, A., Thomas, J.O., Sodeine, O., Bondi, F.S. (1992). Prognostic risk factors and post mortem findings in cerebral malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Sep-Oct; **86**(5):491-3.

**Walker**, D.J., Pitsch, J.L., Peng, M.M., Robinson, B.L., Peters, W., Bhisutthibhan, J., Meshnick, S.R. (2000). Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Feb; **44** (2): 344-347.

**Waller**, D., Krishna, S., Crawley, J. (1995). Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. *Clin Infect Dis.* **21**:577-587.

**Walliker**, D., Quakyi, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarfman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., Carter, R. (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. Jun 26; **236** (4809): 1661-6.

**Walliker** D. (1994). The role of molecular genetics in field studies on malaria parasites. *Int J Parasitol.* Sep; **24**(6):799-808.

- 
- Walter-Sack, I., Klotz, U. (1996).** Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet.* **31**(1):47-64.
- Wang, P., Read, M., Sims, P.F.G., Hyde, J.E. (1997).** Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol.* **23**:979-86.
- Ward, S.A., Bray, P.G. (2000).** Definitive proof for a role of *pfmdr 1* in quinoline resistance in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resistance Update.* Apr; **3** (2): 80-81.
- Warhurst, D.C. (2003).** Polymorphism in the *Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter protein links verapamil enhancement of chloroquine sensitivity with the clinical efficacy of amodiaquine. *Malaria Journal.* Sep 19; **2** (1): 31.
- Warrell, D.A.** Management of severe malaria. (1999). *Parassitologia.* **41**:287-294.
- Watkins, W.M., Woodrow, C., Marsh, K. (1993).** *Falciparum* malaria: differential effects of antimalarial drugs on *in vivo* parasite viability during the critical early phase of therapy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* Jul; **49** (1): 106-12.
- Wattanagoon, Y., Srivilairit, S., Looareesuwan, S., White, N.J. (1994).** Convulsions in childhood malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jul-Aug; **88**(4):426-8.
- Weatherall, D.J., Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., Casals-Pascual, C., Roberts, D.J. (2002).** Malaria and the red cell. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 35-57.
- Wellems, T.E., Panton, L.J., Gluzman, I.Y., do Rosário, V.E., Gwadz, R.W., Walker-Jonah, A., Krogstad, D.J. (1990).** Chloroquine resistance not linked to *mdr*-like genes in a *Plasmodium falciparum* cross. *Nature.* May 17; **345** (6272): 253-5.
- Wernsdorfer, W.H., Payne, D. (1991).** The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology and Therapeutics.* **50** (1): 95-121.
- Wernsdorfer, W.H. (1994).** Epidemiology of drug resistance in malaria. *Acta Tropica.* Mar; **56** (2- 3): 143-56.
- Wernsdorfer, W.H., Noedl, H. (2003).** Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. *Current Opinion Infectious Diseases.* Dec; **16** (6): 553-8.
- White, N.J. (1997).** Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **41**: 1413-1422.

---

**White, N.J.** (1999). Delaying antimalarial drug resistance with combination chemotherapy. *Parassitologia*. **41** (1-3): 301-308.

**White, N.J.** (2004). Antimalarial drug resistance. *Journal of Clinical Investigation*. Apr; **113** (8):1084-92.

**Wichmann, O., Jelinek, T., Peyerl-Hoffmann, G., Mühlberger, N., Grobusch, M.P., Gascon, J., Matteelli, A., Hatz, C., Laferl, H., Schulze, M., Burchard, G., da Cunha, S., Beran, J., McWhinney, P., Kollaritsch, H., Kern, P., Cuadros, J., Alifrangis, M., Gjørup, I.** (2003). Molecular surveillance of the antifolate-resistant mutation I164L in imported African isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe. *Malar J.* Jun **25**;2:17.

**Wongsrichanalai, C., Pickard, A.L., Wernsdorfer, W.H., Meshnick, S.R.** (2002). Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infectious Diseases*. Apr; **2** (4): 209-218.

**World Health Organization.** (1973). Chemotherapy of Malaria and Resistance to Antimalarials. Report of a WHO scientific group. WHO Technical Report Series, 529. *Geneva: WHO*.

**World Health Organization.** (1991). Basic Laboratory Methods in Medical Parasitology.

**World Health Organization.** (2000). Management of severe malaria. Second edition. *Geneva: WHO*.

**World Health Organization.** (2001). *Antimalarial Drug Combination Therapy: Report of a WHO Technical Consultation*. Vol 2001.35. *Geneva, WHO*.

**World Health Organization/UNICEF.** (2003). *Africa Malaria report*. In MAL. Vol MAL/2003. *Geneva, WHO/UNICEF; 2003:120*.

**World Health Organization.** (2005a). World Malaria Report 2005. *Geneva: WHO*.

**World Health Organization.** (2005b). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs: report on global monitoring: 1996-2004. *Geneva: WHO*.

**World Health Organization.** (2006a). Malaria vector control and personal protection: report of a WHO study group.

**World Health Organization.** (2006 b). WHO guidelines for the treatment of malaria. *Geneva: WHO*.

---

**Yamazaki**, H., Shibata, A., Suzuki, M., Nakajima, M., Shimada, N., Guengerich, F.P., and Yokoi, T, (1999), Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P450 2C8 and P450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* **27**: 1260-1266.

**Yipp**, B.G., Baruch, D.I., Brady, C., Murray, A.C., Looareeswan, S., Kubes, P., Ho, M. (2003). Recombinant PfEMP1 peptid inhibits and reverses cytoadherence of clinical *Plasmodium falciparum* isolates in vivo. *Blood*.**101**: 331-337.

**Zhang**, J., Krugliak, M., Ginsburg, H. (1999). The fate of ferriprotophyrin IX in malaria infected erythrocytes in conjunction with the mode of action of antimalarial drugs. *Molecular Biochemical Parasitology*. Mar 15; **99** (1): 129-41.

**Zimmerman**, P.A., Wieseman, M., Spalding, T., Boatn, B.A., Nutman, T.B. (1997). A new intercellular adhesion molecule-1 allele identified in West Africans is prevalent in African-Americans in contrast to other North American racial groups. *Tissue Antigens*. 1997 Dec;**50**(6):654-6.

---

## **VII. ANEXOS**

---

## ANEXO 1

Principais soluções utilizadas neste trabalho:

- dNTPs (Fermentas)– mistura de 10mM dATP, 10mM dCTP, 10mM dGTP e 10mM dTTP.
- High TE – Tris-HCL 100mM (pH 8.0), EDTA (dissódico) 40mM (pH 8.0).
- Solução de Lise Madisen – Tris-HCl 0.1M (pH 8.0), EDTA (dissódico) 40mM (pH 8.0), SDS 0,2%, NaCl 1M.
- Tampão de aplicação (5X) Tris 50 mM (pH 8.0), EDTA 75 mM (pH 8.0), SDS 0.5%, sucrose 30%, ficol 10%, corante *Orange G* 0.25%.
- Tampão de lise – Tris 40 mM (pH 8.0), EDTA 80 mM (pH 8.0), SDS 2%.
- Tampão TBE (10X) (Fermentas)– Tris 1 M, ác. Bórico 1 M, EDTA 50 mM.
- Tampão TE – Tris-HCL 10mM (pH 8.0), EDTA 0.1 mM (pH 8.0).
- Proteinase K – 20mg proteinase K (1mg=20U) em 1 ml de H<sub>2</sub>O.
- NaCl 6M – 87.6 gr NaCl em 250ml de H<sub>2</sub>O.
- PBS - 1tablete de PBS (Sigma, Germany) em 200 ml água destilada, autoclavado
- 0,5% Saponina em PBS 1X: 0,5g saponina (Sigma, Germany) em 100 ml PBS 1X (Sigma, Germany), Autoclavado.
- Tampão de PCR – Tris-HCL 67 mM (pH 8.8), 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,45% Triton X-100, 0.02% gelatina.



---

## ANEXO 2

Soluções utilizadas na electroforese em gel de agarose.

- Tampão de aplicação (Ficol/ Orange G 5x).

50mM Tris/HCl pH 8  
75 mM EDTA (Sigma, Germany) pH 8  
0,5% SDS (Sigma, Germany)  
30% (p/v) Sucrose (Sigma, Germany)  
10% Ficol (Sigma, Germany)  
0,25% (p/v) Orange G (Sigma, Germany)

- Tampão TBE 10X (Stock)

1 M Tris (Sigma, Germany)  
1 M Ácido Bórico (Sigma, Germany)  
50 mM EDTA (Sigma, Germany) pH 8,3

O tampão TBE stock foi preparado concentrado 10X, e diluído de 1/10 quando utilizado na preparação dos geis de agarose (Gibco, BRL) e como tampão de corrida, nas tinas de electroforese.

- Gel agarose 2% - Para volume de 250 ml TBE 1X – 5g de agarose (Gibco, BRL)
- Gel de poliacrilamida 10%

10% (wt/vol) acrilamida, 0.3% (wt/vol) N,N'-methylenebisacrylamide e 7 M de ureia

- Tampão utilizado para correr o gel de poliacrilamida

89 mM Tris (Sigma, Germany), 89 mM Ácido Bórico (Sigma, Germany) e 2 mM de EDTA (Sigma, Germany) pH 8,3

### ANEXO 3

FICHA DE COLHEITA DE DADOS	
Código: _____	Data: __/__/__
Sexo: _____ Idade: _____ Raça: _____ Peso: _____	
Local Residência: _____	
<b><u>Situação clínica quanto à malária/antimaláricos:</u></b>	
Caracterização laboratorial positiva: Sim _____ Não _____	
Tipo de plasmódio: _____ Parasitémia _____	
Forma clínica de malária:	
Malária grave e/ou complicada: Sim _____ Tipo(s) _____ _____, _____, _____, _____, _____	
Malária não complicada: Sim _____	
Malária clínica: Sim _____	
Toma de antimaláricos nas últimas duas semanas: Sim _____ Não _____	
Tipo(s) de antimalárico(s): _____, _____, _____	
Doses tomadas: _____ Dias de tratamento: _____	
<b><u>Abordagem:</u></b>	
Queixa(s) principal(ais)/motivo(s) de consulta: _____, _____, _____, _____ _____, _____, _____, _____, _____	
Diagnóstico(s): _____, _____, _____, _____	
Tratamento(s): _____, _____, _____, _____	
Controlo: Sim _____ Parasitémia _____ Data: __/__/__	
Não _____	
Observações: _____ _____	

## ANEXO 4



**Universidade Eduardo Mondlane**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Pediatria**

### Consentimento informado

Caro Participante:

Pretende-se realizar em estudo para identificar alguns aspectos relacionados com a resistência aos antimaláricos em uso em Moçambique, no tratamento da malária. O estudo faz parte de um projecto de doutoramento e será realizado em colaboração com outras instituições estrangeiras (Portuguesas).

Este estudo irá fornecer informação que contribuirá para que as Autoridades de Saúde Moçambicanas possam providenciar programas de intervenção relacionados à terapêutica da malária no País, para uma possível redução da prevalência desta doença e da morbimortalidade que lhe está associada.

Para participar neste estudo, deverá responder a algumas questões relacionadas à doença (malária) que trouxe a criança a esta unidade sanitária. Esta entrevista durará aproximadamente 10 minutos e a recusa em responder não irá alterar os cuidados clínicos e o tratamento que irá receber neste serviço de saúde. Os dados colhidos serão tratados de forma anónima, e o seu nome e o da sua criança nunca serão mencionados. Toda informação assim obtida será utilizada apenas no âmbito do estudo.

Em caso de qualquer dúvida ou esclarecimento, por favor entre em contacto com a investigadora principal pelo número de telefone: 495046, ou pelo seguinte endereço: Faculdade de Medicina, Avenida Salvador Allende, nº 702, Maputo.

Obrigada pela sua valiosa colaboração

\_\_\_\_\_  
Dra. Natércia Fernandes (Investigadora principal)

Percebi o objectivo e a importância do estudo e por isso aceito participar:

Assinatura do(s) Pai(s), tutores, encarregados de educação ou acompanhante

\_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO 5

Parte das sequências dos genes em estudo que contêm a região de interesse

### Gene *pfdhfr*

N51I, C59R e S108N

TTTATGATGGAACAAGTCTGC GACGTT TTCGATATTTATGCCATATGTGCATGTTGTAAGGTTGAAAGCAA  
AAATGAGGGGAAAAAAATGAGGTTTTTAATAACTACACATTTAGAGGTCTAGGAAATAAAGGAGTATTAC  
CATG GAAATGTATTTCCCTAGATATGgAATATT TTT GTGCAGTTACAACATATGTGAATGAATC AAAATAT  
GAAAAATTGAAATATAAGAGATGTAAATATTTAAACAAAGAACTGTGGATAATGTAAATGATATGCCTA  
ATTCTAAAAAATTACAAAATGTTGTAGTTATGGGAAGAACAACCTGGGAAAGCATTCCAAAAAAATTTAA  
ACCTTTAAGCAATAGGATAAATGTTATATTGTCTAGAACCTTAAAAAAGAAGATTTTGATGAAGATGTT  
TATATCATTAACAAAGTT GAAGATCTAATAGTTTTACTTGGGAAATTAA ATTACTATAAATGTTTTATTA  
TATTAGGTTCCGTTGTTTATCAAGAATT TTAGAAAAGAAATTAATAAAAAAATATATTTTACTAGAAT  
AAATAGTACATATGAATGTGATGTATTTTTTCCAGAAATAAATGAAAATGAGTATCAAATTATT TCTGTTT  
AGGCGATGTATATAC

51 F - TTTATGATGGAACAAGTCTGC GACGTT

51 R - GTGCAGTTACAACATATGTGAATGAATC

59 F - GAAATGTATTTCCCTAGATATGGAATATT

59 R - GAAGATCTAATATTTTACTTGGGAAATTAA

108 F - TTTATGATGGAACAAGTCTGC GACGTT

108 R - TATTAGGTTCCGTTGTTTATCAAGAATT

I164L

TTTATGATGGAACAAGTCTGCGACGTT TTCGATATTTATGCCATATGTGCATGTTGTAAGGTTGAAAG  
CAAAAATGAGGGGAAAAAAATGAGGTTTTTAATAACTACACATTTAGAGGTCTAGGAAATAAAGGA  
GTATTACCATGGAATGTATTTCCCTAGATATGgAATATT TTT GTGCAGTTACAACATATGTGAATGAAT  
CAAAAATATGAAAAATGAAATATAAGAGATGTAAATATTTAAACAAAGAACTGTGGATAATGTAAAT  
GATATGCCTAATTCTAAAAAATTACAAAATGTTGTAGTTATGGGAAGAACAAGCTGGGAAAGCATTCC  
AAAAAAATTTAAACCTTTAAGCAATAGGATAAATGTTATATTGTCTAGAACCTTAAAAAAGAAGATTT  
TGATGAAGATGTTTATATCATTAACAAAGTTGAAGATCTAATAGTTTACTTGGGAAATTAAATTACTA  
TAAATGTTTATTTATTA TTAGGTTCCGTTGTTTATCAAGAATT

### Gene *pfdhps*

A437G

CTACAGCAATCGTTGGAGAAACAGG TAGTGGAATAACAAC TTTATGAATCTCTTATTAAGATTTTATG  
ACTTGAAAAATGATCATTATATTAATAAATGATATGACAAATTTTCAAGATTATCAAAATAATAATA  
ATAATTCAATTGGTTTTAAAAAATGTAATGAATTTTCAAACCAATCTGGATCTGCAGAAGATTATAC TG  
TATTTAATAATAATGGAGAAATATTTATAGATGATATTAATATATGTGATTATAACTTAAGA GATCTTA  
GAAACTTATTTCAATAGTTAGTCAAGAACC CATGTTATTTAATATGTC CATATATGAAAAATATCAAAT  
TGGAAGAGAAGATGCAACATTGGAAGATGTTAAACGTGTTAGTAAGTTTGCTGCTATAGATGAATTT  
ATCGAATCATTACCAAATAAATATGATACAAATGTTGGACCATATGGTAAAAGCTTATCAGGTGGACA  
AAAAACAG

K540E

TGCTAGTGTTATAGATATAGGTGGAGAAagCCTCTGGTCCTTTTGTATACCTAATCCAAAAA  
TTAGTGAAAGAGATTTAGTAGTACCTGTATTACAATTATTTCAAAAAGAATGGAATGATATA  
AAAAATAAAATTGTTAAATGTGATGCGAAACCAATTATAAGTATTGATACAATTAACATATAA  
TGTTTTTAAAGAATGTGTTGATAATGATTTAGTTGATATATTAAATGATATTAGTGCTTGAC  
AAATAATCCAGAAATTATAAAATTATTAACAAAAACAAATTCTATAGTGTAGTTCTAA  
TGCATAAAAGAGGAAATCCACATACAATGGATGA<sup>A</sup>CTAACAAATTATGATAATCTAGTTTAT  
GATATAAAAAATTATTTAGAACAAAGATTAAATTTTCTTGATTAAATGGAATACCTCGTTA  
TAG

**Gene *pfmdr1***

N86Y

TTGATT<sup>T</sup>TTGTGTTGAAA<sup>G</sup>ATGGGGTAAAGAGCAGAAAAGAGA AAAAAAGATGG TAACCTCAGT  
ATCAAA<sup>G</sup>AAAGAGGTTGAAAA AGAGTTGAAC AAAAAAGAGTA CCGCTGAATT ATTTAGAAAA  
ATAAAGAAATGAGAAAAATATC ATTTTTT<sup>T</sup>TA CCGTTTAAAT GTTTACCTGC ACAACATAGA  
AAATTATTTATTTATATCAT<sup>T</sup> T GTATGTGCTGTATTTATCAGGAGGAACATT ACCTTTTTT<sup>T</sup>  
ATATCTGTGTTTGGTGTAAT ATTAAGAAGAC ATG<sup>A</sup>(<sup>T</sup>)<sup>AT</sup>TTAG GTGATGATAT TAATCCTATA  
ATATTATCATTAGTATCTAT AGGTTTAGTA CAATTTATAT TATCAATGAT ATCAAGTTAT  
TGTATGGATGTAA<sup>T</sup>TACATC AAAAAATATTA AAAACTTTAA AGCTTGAATA TTTAAGAAGT  
GT<sup>T</sup>TTT<sup>T</sup>TATCAAGATGGACA ATTTCATGAT AATAATCCTG GATCTAAAT<sup>T</sup> AAGATCTGAT  
TTAGATTTT<sup>T</sup>TATTTAGAACAA A GTGAGTTCA GGAATTGGTA CGAAATTTAT AACAA<sup>T</sup>TTT<sup>T</sup>

D1246Y

CTACAGCAATCGTTGGAGAAACAGGTAGTGAAAAATCAACTTTTATGAATCTCTTATTAAGATTTTATG  
ACTTGAAAAATGATCACATTATATTAACAAAAATGATATGACAAATTTTCAAGATTATCAAAATAATAATA  
ATAATTCAATGGT<sup>T</sup>TTTAAAAAATGTAAATGAATTTTCAAACCAATCTGGATCTGCAGAAGATTATAC TG  
TATTTAATAATAATGGAGAAATATTTATAGATGATATTAATATATGTGATTATAACTTAAGAT<sup>TAT</sup>CTTA  
GAAACTTATTTTCAATAGTTAGTCAAGAACCCATGTTATTTAATATGTCCATATATGAAAAATATCAAA<sup>T</sup>  
TGGAAGAGAAGATGCAACATTGGAAGATGTTAAACGTGTTAGTAAGTTTGTGCTATAGATGAATTT  
ATCGAATCAT<sup>T</sup>TACCAAATAAATATGATACAAATGTTGGACCATATGGTAAAAGCTTATCAGGTGGACA  
AAAACAG

**Gene *pfcr1***

N75E

N

GATGGCTCACGTTTAGGTGGAGGTTCTTGCTCTGGTAAATGTGCTCATGTGTTTAAACTTATTTT<sup>T</sup>TAA  
AGAGATTAAGGATAATATTTTATTTATATTTTAAAGTATTATTTATTTAAGTGATGTGTAATG<sup>AA</sup>AC  
AATTTTGTCTAAAAGAAC<sup>T</sup>TTA

E

GATGGCTCACGTTTAGGTGGAGGTTCTTGCTCTGGTAAATGTGCTCATGTGTTTAAACTTATTTT<sup>T</sup>TAA  
AGAGATTAAGGATAATATTTTATTTATATTTTAAAGTATTATTTATTTAAGTGATGTGTAATG<sup>GAAAC</sup>  
AATTTTGTCTAAAAGAAC<sup>T</sup>TTA

K76T

GATGGCTCACGTTTAGGTGGAGGTTCTTGCTCTGGTAAATGTGCTCATGTGTTTAAACTTATT  
TTTAAAGAGATTAAAGGATAATATTTTATTTATATTTTAAAGTATTATTTATTTAAGTGATGT  
GTAATGAAT<sup>AA</sup>ATTTTGTCTAAAAGAAC<sup>T</sup>TTAAACAAAATTGGTAACTATAGTTTGTAAAC  
ATCCGAAACTCACAACTTTATTTGTATGATTATGTTCTTTATTGTTTATTCCTTATTTGGAAAT  
AAAAAGGGAAATTCAAAAG

---

**Gene *pfATPase6***

R37K

TATTAATAAAAA TATATTAATATATATAATAATATATATATATATATATATATATATATATATGTGTT  
TATTTTATATTATTTAATTTATTTTCGTTGAACCTTATTATATCTTTGTCATTCTGAAATTATTTATT  
ATTATACATAATA TTTTGGTTTGTATATATAA GAATGGAAAGAGGTTATTAA GAATGCTCATACAT  
ACGATGTTGAGGATGTA CTAAAA TTTTGGATGTAAA CAAA GATAATGGTTTAAA GAATGAGGA  
ATTGGATGATA GAA **G(A)**ATTAAAA TATGGTTTGAATGAATTA GAAGTAGAAAAGAA GAAAA GTA  
TTTTTGAATTGATATTAATCAATTTGATGATTTATTAGTAAA GATA TTATTACTAGCTGCATTC  
ATTAGTTTCGTGTTAACTTTATTA GATATGAAACATAAAAAAATA GAAATATGTGATTTTATTGA  
ACCATTAGTTATAGTATTAAATATTAATATTAATGCTGCCGTAGGTGTATGGCAA GAAT

G639D

ACTTAGCTTTGCTTATAAAAACTTAA **G(A)**TAGTAAA GATTTAAATATTAA GAATACAGATGATTAA  
TTATAAATTAGAACAAGATTTAATTTATTTAGGTGGATTAGGTATTATTGATCCACCACGTAAAT  
ATGTAGGAAGA GCAATTAGATTATGCCATATGGCTGGTATACGTGTATTTATGATTACAGGTGA  
TAATATTAATACGGCCAGAGCTATAGCTAAAGAAATTAATATATTAATAAAAAATGAAGGAGAT  
GATGAAAAGGATAATT

G639D

TATAGGAGAAAAATACATTTGATCATG **G(A)**CACAAGTTTTGAAAATTGTTTCCACTCAAAATTGG  
GTAATAAAATAAATACCACATCAA CACA TAATAATAATAA CAA CAATAATAATAATAGTAATAG  
TGTCCAAGTGAATGTATTTCTTCTTGGAGAAATGAATGT

T2694A

GAATTGTTTTCTGTAGAA CTGAACCTAAACATAAAAAA CAAATT **(A)**GTAAAA GTATTAAAAAGAC  
TTAGGA GAAA CAGTTGCTATGACAGGTGATGGTGTAAATGATGCCAGCATTGAAATCAGCT  
GACATAGGAATAGCTATGGGTATTAATGGAACGGAGGTAGCTAAAGAAGCATCAGAT

## ANEXO 6

### Marcadores moleculares de resistência (tratamento com Fansidar ®)

Dia da colheita	Gene				
	<i>pfdhfr</i>			<i>pfdhps</i>	
	51	59	108	437	540
D0	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Asn + Ile	Cys + Arg	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Asn + Ile	Cys (C)	Ser + Asn	Ala (A)	Lys (K)
DC	—	—	—	—	—
DO	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Ser (S)	Gly (G)	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
D0	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Asn (N)	Cys + Arg	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)

DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Cys (C)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Cys (C)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Asn (N)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Cys + Arg	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)



DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Lys (K)
DC	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Asn + Ile	Cys (C)	Ser + Asn	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Asn + Ile	Cys (C)	Ser + Asn	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Asn (N)	Cys (C)	Ser (S)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly (G)	Glu (E)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Lys (K)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ala (A)	Glu + Lys
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Gly + Ala	Glu + Lys

Marcadores moleculares de resistência (tratamento com Fansidar ®+Amodiaquina)

Dia da colheita	Genes							
	<i>pfdhfr</i>				<i>pfdhps</i>		<i>pfmdr1</i>	
	51	59	108	164	437	540	86	1246
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Asn + Ile	Cys (C)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg + Cys	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Asn (N)	Cys (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
D0	Asn + Ile	Cys (C)	Asn + Ser	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp + Tyr
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)

DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Asn + Ile	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn (N)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Asn (N)	Asp(D)
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp + Tyr

DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Cys (C)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
DO	Asn + Ile	Cys (C)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile	Arg (R)	Asn + Ser	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn(N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn(N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Tyr(Y)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn(N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Tyr(Y)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn(N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Asn + Tyr	Asp(D)
DO		Arg +Cys	Asn + Ser	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DO	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DO	Asn (N)	Arg (R)	Asn + Ser	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)

DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn(N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp + Tyr
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
D0	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Asn (N)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Tyr(Y)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Asn (N)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Asn + Ile	Cys (C)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Cys (C)	Ser (S)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Tyr (Y)	Tyr(Y)
DC	Ile (I)	Indeter.	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Asn + Tyr	Tyr(Y)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Lys (K)	Asn (N)	Asp(D)
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly + Ala	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp + Tyr
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	-	-	-	-	-	-	-	-
D0	Ile (I)	Arg + Cys	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Asp + Tyr
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Tyr (Y)	Tyr(Y)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Tyr (Y)	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn (N)	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Asn (N)	Arg (R)	Ser (S)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu (E)	Asn + Tyr	Asp(D)
D0	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Ala (A)	Lys (K)	Asn + Tyr	Asp(D)
DC	Ile (I)	Arg (R)	Asn (N)	Ile (I)	Gly (G)	Glu + Lys	Asn + Tyr	Asp(D)

D0- antes do tratamento  
DC- depois do tratamento